LA BIOSYNTHÈSE DE LA SCOPOLÉTINE DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*

PAR

BERNARD FRITIG

STRASBOURG 1968

N° d'ordre:

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR -ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

BERNARD FRITIG

INGÉNIEUR E.N.S.C.S.
ATTACHÉ DE RECHERCHES AU C.N.R.S.

PREMIÈRE THÈSE

LA BIOSYNTHÈSE DE LA SCOPOLÉTINE DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*

DEUXIÈME THÈSE

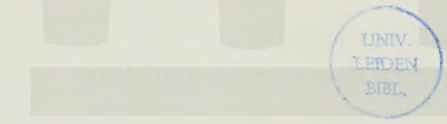
PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 22. juin 1968 devant la Commission d'Examen:

M. G. OURISSON	Président
M. L. HIRTH	Membre du Jury
M. R. J. GAUTHERET (MEMBRE DE L'INSTITUT	Membre du Jury
M. H. DURANTON	Membre du Jury
M. L. BERGMANN	Membre du Jury

Imprimé Berenz
Représentant: M. Kiefer – Nouvelle Cité 17 – 67 Lingolsheim

Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41550013_0007

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DES SCIENCES

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN
Doyens Honoraires : A.KIRRMANN, P.LACROUTE, H.J.MARESQUELLE, G.MILLOT
Professeurs Honoraires :P.DE BEAUCHAMP, L.BOISSELET, H.CARTAN,G.CERF, C.CHABAUTY, A.CHRETIEN, J.DENY, Ch.EHRESMANN, M.FRECHET, H.GAULT Mle S.GILLET, A. HEE, R.HOCART, A.KIRRMANN, G.LEMEE, P.L'HERITIER A.LICHNEROWICZ, L.NEEL, Ch.SADRON, E.TERROINE, R.THIRY, H.VILLAT H.WEISS, Et.WOLFF, J.YVON.

Maître de Conférence Honoraire : R.WEIL.

Professeurs :

H.J.MARESQUELLE.....	T.	Biologie Végétale
A.ROUSSEL.....	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H.FORESTIER.....	T.	Chimie générale
J.ROTHE.....	T.	Physique du Globe
P.LACROUTE.....	T.	Astronomie
J.H.VIVIEN.....	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A.MAILLARD.....	T.	Physicochimie du Pétrole
S.GORODETZKY.....	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L.SACKMANN.....	T.	Mécanique des Fluides
J.BYE.....	T.	Chimie Physique
R.LOMBARD.....	T.	Chimie organique
Mle M.PEREY.....	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB.....	T.	Minéralogie et Pétrographie
P.JOLY.....	T.	Biologie générale
H.BENOIT.....T.		Physicochimie macromoléculaire
P. CUER.....	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G.MILLOT.....	T.	Géologie et Paléontologie
R.LECOLAZET.....	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER.....	T.T.P.	Minéralogie
R.ROHMER.....	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU.....	T.T.P.	Botanique
S.NIKITINE.....	T.	Physique générale
F.STUTINSKY.....	T.	Physiologie générale
B. WURTZ.....	T.T.P.	Chimie biologique
J.BRENET.....	T.	Electrochimie
G.OURISSON.....	T.T.P.	Chimie
A.COCHE.....	T.T.P.	Physique nucléaire
R.CERF.....	T.	Physique générale
J.FRENKEL.....	T.T.P.	Mathématiques
P.TAGLANG.....	T.	Physique
J.P.LONGHAMP.....	T.T.P.	Physique
A.DELUZARCHE.....	T.T.P.	Chimie
J.B.DONNET.....	T.T.P.	Chimie Physique
R.ARMBRUSTER.....	T.T.P.	Physique
A.ROCHE.....	T.T.P.	Physique du Globe
L.HIRTH.....	T.	Microbiologie
A.SIGOT.....	P.S.C.	Zoologie
J.COGNE.....	T.T.P.	Géologie
A.FUCHS.....	T.	Mécanique rationnelle
A.GALLMANN.....	T.T.P.	Physique
P.MIALHE.....	T.T.P.	Physiologie animale
J.P.EBEL.....	T.	Chimie biologique
J.PARROD.....	T.T.P.	Chimie

R.WEY..... T.T.P.Chimie
Mme D.MAGNAC..... T.T.P.Physique
M.DAUNE..... P.S.C.Physique
J.P.ADLOFF..... T.T.P.Chimie nucléaire
D.BERNARD..... T.T.P.Méthodes mathématiques de la physique
M.ZISMAN..... T.T.P.Mathématiques
E.DANIEL..... T. Physique expérimentale
P.CHEVALLIER..... T. Physique
J.GREMILLARD..... T.T.P.Mécanique des Fluides
P.CARTIER..... T. Mathématiques M.P.C.
G.REEB..... T. Topologie
F.NORGUET..... T. Analyse supérieure
R.CHAUVIN..... T. Psychophysiologie
J.WUCHER..... P.S.C.Physique
Mme M.BRINI..... P.S.C.Chimie
G.PERNY..... P.S.C.Physique
R.BARO..... P.S.C.Physique
H.DURANTON..... P.S.C.Botanique
R.WEISS..... T.T.P.Chimie
P.FEDERLIN..... T.T.P.Chimie
J.LERAY..... P.S.C.Physique
J.P.SCHWING..... P.S.C.Chimie
M.SIESKIND..... P.S.C.Physique
G.MONSONEGO..... P.S.C.Physique mathématique
P.GABRIEL..... T.T.P.Mathématiques
C.WIPPLER..... T. Physicochimie des Hauts Polymères industriels
P.A.MEYER..... T.T.P.Mathématiques
G.WEILL..... P.S.C.Physique
J.M.BLOCH..... T. Chimie
E.FOLLENIUS..... P.S.C.Zoologie
A.CLAUSS..... P.S.C.Chimie
J.LUCAS..... P.S.C.Géologie
G.GLAESER..... T. Mathématiques
J.J.THIEBOLD..... P.S.C.Biologie animale

Professeurs Associés :

S.R.DE GROOT..... Physique
K.VESELY..... Physicochimie macromoléculaire
R.MARCHESSAULT.....Physicochimie macromoléculaire
G.LUMER..... Mathématiques
R.MORIARTY..... Chimie organique
J. AUSLANDER..... Physique corpusculaire

Maîtres de Conférences :

H.DANAN..... Physique
Mme WINTER Ch..... Physique
J.P.EBERHART..... Minéralogie
Mme D.CAGNIANT..... Chimie
X. FERNIQUE..... Mathématiques
J.STREITH..... Chimie
J.H.WEIL..... Chimie biologique
F.GAUTIER..... Physique propédeutique
G.SUTTER..... Physique électronique
D.FOATA..... Mathématiques
J.L.VERDIER..... Mathématiques
J.M. LEHN..... Chimie
Cl.ROBERT..... Physique
M. LACROUTE..... Biologie végétale

M. GOUNOT..... Botanique
J.PRADINES..... Mathématiques
A.GIRARDIE..... Biologie animale
F.BECKER..... Physique mathématique
J.DEHAND..... Chimie minérale
Cl.GODBILLON..... Mathématiques
M.KAROUBI..... Mathématiques
A.MIGNOT..... Mathématiques appliquées

Maître de conférence Associé :

V.AVANISSIAN..... Mathématiques

Secrétaire : G. SAINT-PE

A mes parents

A ma femme

A tous les miens

Monsieur le Professeur HIRTH,

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans votre groupe. Je vous dois non seulement le sujet de ce travail, mais aussi les nombreux encouragements et conseils qui m'ont permis de le faire aboutir.

Monsieur le Professeur OURISSON,

Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude pour tous les conseils que vous m'avez prodigués et pour l'intérêt très vif que vous avez manifesté tout au long de ce travail.

Je remercie tous mes camarades, en particulier P.BENVENISTE, J.D.EHRHARDT, M.HEWLINS et U.EPPENBERGER avec lesquels j'ai eu de fructueuses discussions.

Mes remerciements vont également à Madame Paulette SCHMITT pour sa précieuse collaboration technique.

Je suis heureux de témoigner ma reconnaissance à Mesdemoiselles Andrée DURR et Pierrette FUND qui ont obtenu et entretenu les tissus cultivés *in vitro* utilisés dans mes expériences. Sans leur aide et leur compétence ce travail n'aurait pas pu être effectué.

Les recherches résumées dans cette thèse ont été entreprises dans le cadre de la Recherche Coopérative sur Programme n° 34 intitulée:

"L'utilisation des tissus végétaux cultivés in vitro pour l'étude des produits naturels".

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans la mise à notre disposition d'un laboratoire de recherches par Monsieur le Professeur J.H. VIVIEN , Directeur du Département des Applications Biologiques du Centre de Recherches Nucléaires de Cronenbourg.

INTRODUCTION

Les plantes contiennent des composés phénoliques variés dont le rôle biologique est mal connu et dont la biosynthèse*, au moins pour certains d'entre eux, comporte encore des points obscurs ou sujets à discussion.

Si leur rôle biologique n'est pas connu avec certitude, on sait au moins qu'ils sont impliqués dans les processus de défense des plantes aux agressions parasitaires et que des interactions existent également entre l'activité des substances de croissance et ces mêmes phénols. Ces deux points sont particulièrement importants en biologie végétale et renforcent l'intérêt que présente toute recherche susceptible de contribuer à mieux connaître les substances phénoliques, notamment sous un aspect dynamique.

Nous avons décidé d'étudier dans un premier temps la formation de phénols dans des tissus sains. Il nous fallait donc choisir un matériel favorable à une étude biosynthétique à l'aide d'éléments marqués et contenant, à l'état sain, des quantités suffisantes de ces produits : en effet, bien des végétaux ne contiennent dans les conditions normales que des quantités assez faibles de phénols ; ceux-ci n'apparaissent en concentration importante qu'à la suite d'une infection virale, bactérienne ou fongique (1-15).

* Rappelons qu'on appelle processus biosynthétiques les étapes réellement suivies dans les systèmes biologiques pour la formation des métabolites étudiés. Un schéma biogénétique est au contraire une hypothèse, cherchant à rendre compte à priori des relations structurales entre une série de métabolites.

Les tissus de Tabac cultivés in vitro répondent à toutes ces exigences : des observations antérieures (16, 17) ont montré qu'ils étaient plus riches en produits phénoliques que la plante-mère (18). De plus, il s'agit d'un matériel favorable à l'étude des problèmes de croissance (19) et présentant des qualités d'utilisation voisines de celles des cultures bactériennes :

- La possibilité de travailler stérilement (mise en culture et incubations) donne la garantie d'utiliser un matériel sain.

- Les tissus de Tabac cultivés in vitro sont parfaitement reproductibles et poussent sur un milieu entièrement synthétique, donc rigoureusement contrôlé.

- Ils sont dépourvus d'organes, ce qui est d'un grand intérêt pour l'utilisation d'élements marqués :

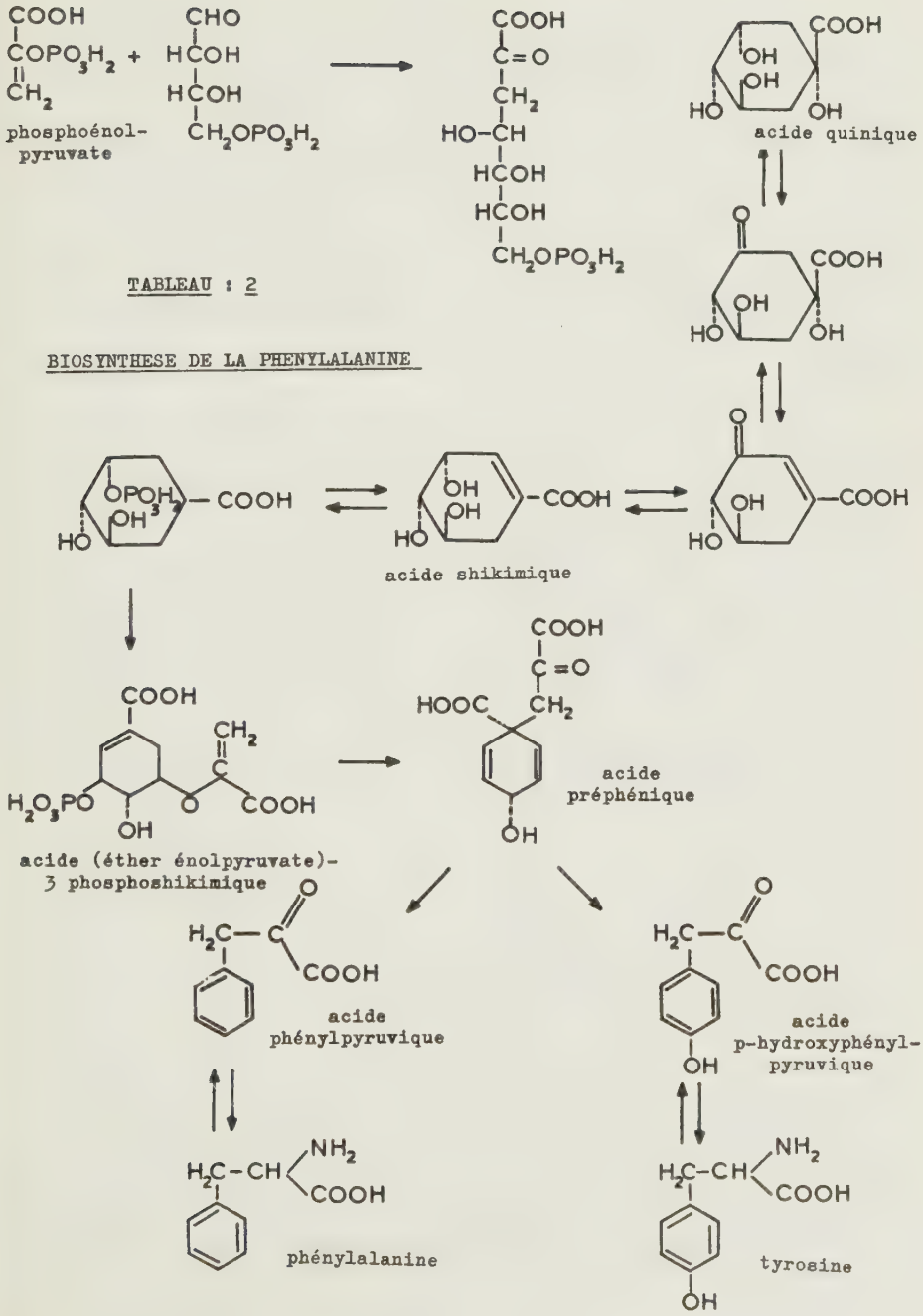
le transport des précurseurs radioactifs se limite à la pénétration dans les cellules, il n'y a donc pas à faire intervenir les problèmes liés au transport mécanique dans une plante entière ;

les marquages peuvent par conséquent être très courts : nous avons effectué couramment des incubations de cinq minutes, ce qui ne peut pas être réalisé avec des plantes ou des organes entiers.

- Enfin, il est possible d'utiliser des conditions anaérobies.

Il n'était pas question d'étudier toutes les substances phénoliques présentes dans les tissus de Tabac, aussi avons-nous porté notre intérêt sur l'une d'entre elles, qui intervient d'une manière particulièrement nette, aussi bien dans les phénomènes de défense que dans ceux liés à la croissance (18-22) : la scopolétine (5) présente dans les tissus sous forme libre et surtout sous forme de son monoglucoside, la scopoline.

Le travail que nous présentons ici concerne l'étude de la biosynthèse de la scopolétine. Nous l'avons orienté en tenant compte


phosphoénol-pyruvate
acide quinique
TABLEAU : 2
BIOSYNTHESE DE LA PHENYLALANINE
acide shikimique
acide (éther énolpyruvate)-3 phosphoshikimique
acide préphénique
acide phénylpyruvique
acide p-hydroxyphényl-pyruvique
phénylalanine
tyrosine

des objectifs que nous nous étions fixés : il ne s'agissait pas seulement d'établir un schéma biosynthétique, mais d'établir un bilan dynamique, d'évaluer le renouvellement de la scopolétine, de la scopoline et de toutes les substances pouvant leur être reliées biogénétiquement. D'autre part, il nous importait moins de connaître toutes les transformations possibles que de déterminer l'importance de chacune d'elles in vivo et dans les conditions normales. Ces considérations nous ont imposé l'utilisation d'une méthodologie un peu particulière, notamment en ce qui concerne les techniques de marquage radioactif.

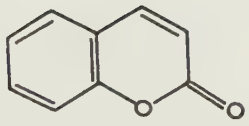
Avant de présenter les résultats de nos expériences, nous donnerons une idée de la répartition de la scopolétine dans les végétaux et nous résumerons les travaux les plus récents concernant sa biosynthèse et celle de substances de la même famille.

La scopolétine est l'hydroxy-7-méthoxy-6-coumarine (5). Les coumarines sont très répandues dans le règne végétal. Le représentant le plus simple de la famille, la coumarine (1), a été décelé dans vingt-sept familles botaniques. On connaît environ cinquante coumarines hydroxylées, plus ou moins répandues, dont les plus connues sont des phénols : l'ombelliférone (2), l'herniarine (3), l'esculétine (4), la scopolétine (5). Celle-ci se rencontre fréquemment dans la famille des Solanacées, en particulier dans le genre Nicotiana.

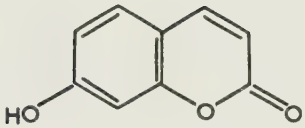
Sa biosynthèse a été peu étudiée. Il faut cependant citer les travaux de REZNIK et RUNECKLES (23, 24) qui remarquent un marquage de la scopoline à partir d'acide férulique et ceux de REID qui a comparé les efficacités d'un certain nombre de précurseurs possibles (25).

Par contre, on a beaucoup mieux étudié la biosynthèse de trois coumarines moins substituées que la scopolétine : la coumarine proprement dite, l'ombelliférone (2) et l'herniarine (3). On a ainsi démontré la formation de ces substances à partir de phénylalanine, dont la biosynthèse est résumée dans le tableau II. Rappelons que ce schéma a tout d'abord été établi pour des microorganismes : c'est en

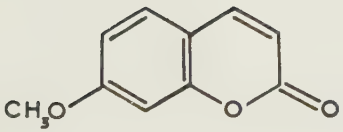
TABLEAU I



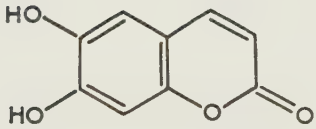
I Coumarine



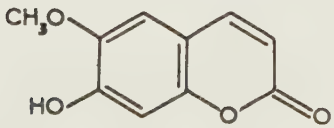
2 Ombelliférone



3 Herniarine



4 Esculétine



5 Scopolétine

particulier à partir d'Escherichia coli qu'ont été isolés la plupart des systèmes enzymatiques responsables des transformations chimiques indiquées. L'isolement et l'étude de la plupart de ces enzymes à partir de végétaux supérieurs ont permis ensuite de généraliser ce schéma biosynthétique et de confirmer le rôle important joué par l'acide shikimique.

Nous donnons dans le tableau III le schéma proposé en ce qui concerne les étapes postérieures à la phénylalanine, et conduisant à l'ombelliférone, coumarine la plus voisine de la scopolétine ; notons que la cyclisation ferait intervenir un processus assez compliqué dans lequel les glucosides de phénols jouent un rôle important (26-30).

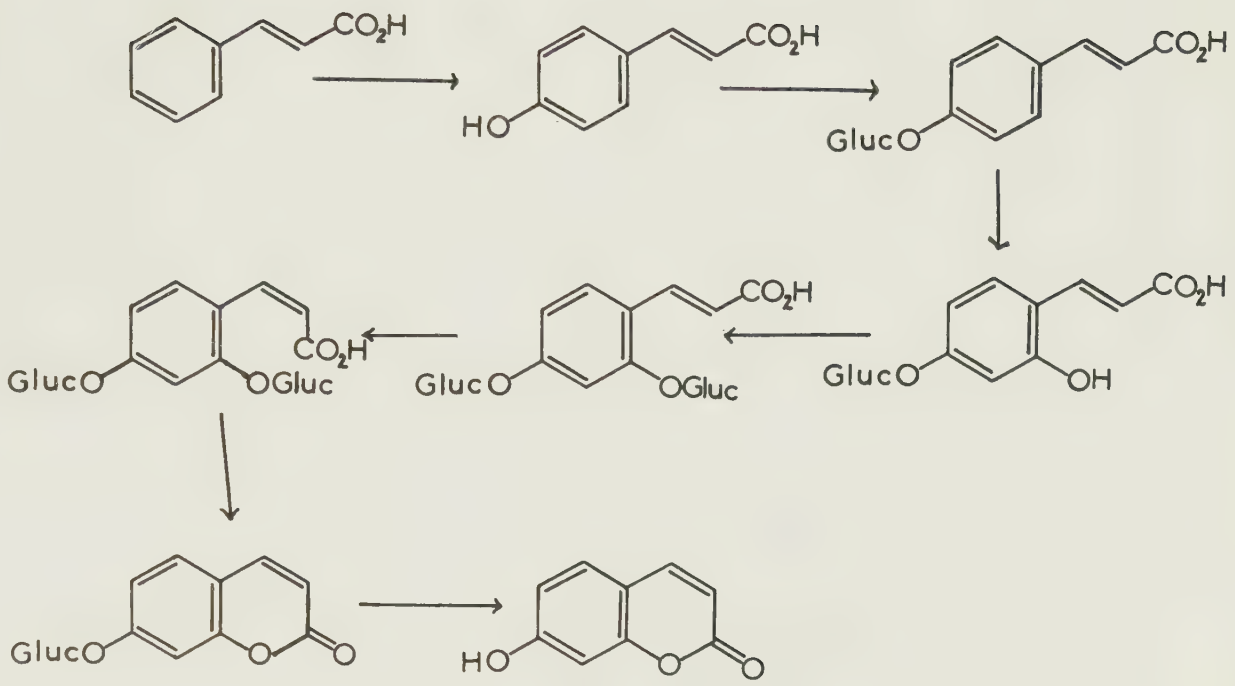
Ce travail comprend deux parties :

- la première concerne l'évolution des teneurs en scopolétine et en scopoline au cours de la croissance de tissus de Tabac cultivés in vitro sains ou infectés par le Virus de la Mosaïque du Tabac,

- la deuxième concerne l'étude biosynthétique proprement dite, étude effectuée à l'aide d'éléments radioactifs.

TABLEAU 2

Biosynthèse de l'ombelliférone
(BROWN, TOWERS, AUSTIN, MEYERS)



MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL

Les tissus de Tabac ont été cultivés *in vitro* dans des conditions déjà décrites (31). Nous avons utilisé une souche possèdant d'intéressantes propriétés :

- sa stabilité, propriété très importante pour une bonne reproductibilité du matériel ;
- l'anergie à l'auxine : dans les expériences de marquage nous avons pu utiliser un milieu dépourvu d'auxine : toute interaction entre le métabolisme des phénols et celui des substances de croissance exogènes est donc supprimée ;
- la croissance rapide sur un milieu nutritif qui peut être très simple.

Nous donnons dans le tableau 4 la composition des différents milieux de culture utilisés dans nos expériences.

TABLEAU 4

Composition des milieux utilisés

Substances *	Milieux		
	(A)	(B)	(C)
50 ml/l de solution minérale	de KNOP (31)	de KNOP	de SKOOG (32)
Saccharose	35	35	35
Gélose	8,5	8,5	9,5
Vitamine B_1	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
Solution minérale de microéléments	-	de HELLER(33)	de SKOOG (32)
Kinétine	0	0	$2\text{-}10^{-4}$
Acide indole-acétique	0	0	$2\text{-}10^{-3}$

* la concentration des substances est exprimée en grammes / litre.

II - METHODES

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons surtout effectué des dosages de scopolétine, de scopoline et d'azote protéique : le détail de ces opérations est donné dans la partie expérimentale.

En ce qui concerne l'étude biosynthétique proprement dite, dont les opérations sont également décrites en détail plus loin, il nous paraît important de préciser ici le principe des expériences et des mesures effectuées, leur validité, leur spécificité, l'interprétation de leurs résultats.

1) Expériences

Rappelons le principe des trois méthodes utilisables pour démontrer un schéma biogénétique que nous supposerons du type le plus simple : A $\longrightarrow$ B $\longrightarrow$ C, où A est un précurseur non exclusif, donnant notamment l'intermédiaire B, précurseur spécifique du produit étudié C (figure 1).

a) Une première possibilité consiste à chercher à démontrer l'incorporation de B dans C, par fourniture au système biologique de la substance B, sous forme radioactive et isolement de C radioactif. Cette méthode souffre de plusieurs limitations. Des résultats négatifs peuvent être dûs simplement à des difficultés de pénétration cellulaire. Des résultats positifs avec B_1 (figure 1a) prouvent seulement que le produit B_1 est utilisable, que ceci mette en jeu une transformation directe $B_1 \longrightarrow C$, une transformation du faux précurseur B_1 en vrai précurseur B, ou une dégradation $B_1 \longrightarrow A$ en précurseur initial. On peut souvent éliminer cette dernière possibilité en utilisant des précurseurs marqués sur un site, dont on peut prévoir le devenir dans les diverses étapes et en vérifiant dans le produit final, par dégradation sélective, que le marquage est bien présent seulement aux positions prévues. La quasi-totalité des travaux biosynthétiques actuels utilisent cette méthode.

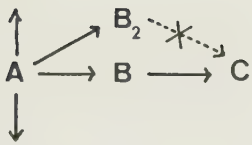


FIGURE : I

SCHEMA BIOSYNTHETIQUE A DEMONTRER

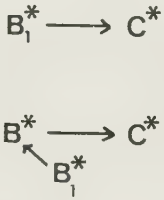


FIGURE : Ia

LES 3 POSSIBILITES SI ON OBTIENT C* A PARTIR DE B_I^*

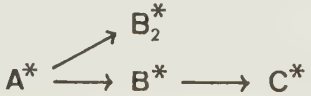


FIGURE : Ib

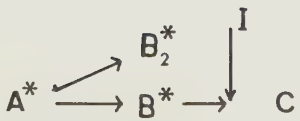


FIGURE : Ic

b) Une seconde possibilité consiste à administrer le précurseur initial A, sous une forme radioactive, et à suivre le marquage de B et de C. Si le précurseur marqué A a été ajouté en quantité suffisamment faible (ce qui suppose une forte activité spécifique), on peut admettre que sa présence ne modifie pas les processus biosynthétiques normaux. Une étude cinétique peut permettre de suivre le marquage progressif de B et C, et de vérifier si B est bien un précurseur de C, ou simplement un produit formé parallèlement (cas B_2, figure 1b). Cette méthode a été notamment illustrée par l'utilisation d'acétate ou de CO_2 radioactifs.

c) Une troisième possibilité consiste à chercher à bloquer sélectivement une étape, par l'utilisation d'un inhibiteur I (ou par anaérobiose). Les produits antérieurs à l'étape bloquée (ici B, figure 1c) s'accumulent aux dépens du produit C. Généralement, on augmente la sensibilité de cette méthode en la combinant avec l'administration d'un précurseur initial radioactif A . Elle présente l'inconvénient inhérent à toute intoxication d'un système biologique : les résultats obtenus ne prouvent au mieux que le comportement du système intoxiqué ! Ils doivent donc être vérifiés par les autres méthodes.

Nous avons utilisé concurremment ces trois méthodes, sous une forme appropriée à nos problèmes. En particulier, nous avons été amenés à donner un développement nouveau et original à la seconde méthode.

Précisons enfin que nous avons toujours utilisé des précurseurs d'activité spécifique aussi élevée que possible afin d'administrer de faibles quantités de substance et par conséquent de perturber le moins possible l'ensemble des métabolismes.

2) Analyses des extraits méthanoliques

a) Etude qualitative

Le problème posé est de faire correspondre un marquage

radioactif à une substance donnée. La méthode classique consiste à recristalliser le produit étudié après addition ou non d'entraîneur et à vérifier que son activité spécifique reste constante. On rencontre de sérieuses difficultés si l'on est en présence de produits qui cocristallisent. Nous pensons qu'il s'agit là davantage d'une méthode de contrôle que de démonstration. Elle est généralement utilisée avec plusieurs dérivés cristallisés.

En général, nous avons procédé de façon différente : les substances qui nous intéressaient ont été extraites par des procédés aussi spécifiques que possible. Nous les avons ensuite purifiées par chromatographie, et à chaque étape, nous avons testé la correspondance entre la position des substances et la répartition de la radioactivité grâce à des lecteurs de radioactivité. Nous avons combiné le maximum de procédés : chromatographies sur papier et sur couche mince de silicagel, chromatographies d'absorption et de partage.

Les produits ainsi isolés ont été étudiés ensuite en "radiochromatographie fonctionnelle" (34) : c'est-à-dire que nous les avons chromatographiés après les avoir transformés par des réactions chimiques spécifiques (saponification d'esters, hydrolyse acide de glucosides, méthylation d'acides carboxyliques, acétylation et méthylation de phénols, isomérisation de doubles liaisons). Nous avons repéré la position des entraîneurs et montré que la radioactivité leur était superposable avant et après les transformations chimiques citées. Enfin, certains dérivés fonctionnels ainsi obtenus ont été recristallisés à activité spécifique constante.

b) Etude quantitative

Les radioactivités mesurées ont été exprimées en désintégrations par minute (dpm) ou en microcuries (uC). Rappelons la relation existant entre ces deux unités :

$$1\ uC = 2,23 \times 10^6\ dpm\ ; \qquad 1\ dpm = \frac{1\ cpm}{\text{rendement du compteur}}$$

Quand cela était possible, nous avons déterminé l'activité spécifique des substances isolées, c'est-à-dire leur activité

rapportée à l'unité de masse. Cette grandeur est indépendante des pertes dues à la purification ; elle est indispensable pour l'étude des cinétiques de formation et elle permet de se rendre compte de l'efficacité d'un précurseur dans la biosynthèse d'un produit donné par le calcul du facteur de dilution isotopique :

$$\text{Facteur de dilution} = \frac{\text{Activité spécifique du précurseur}}{\text{Activité spécifique du produit étudié}}$$

La spécificité d'un précurseur a été évaluée à l'aide du rendement d'incorporation :

$$\text{Rendement d'incorporation} = \frac{\text{Activité mesurée pour le produit étudié}}{\text{Activité métabolisée}}$$

L'activité métabolisée est déterminée de la façon suivante : activité fournie - activité restant dans le milieu - activité du précurseur réextrait.

c) Contrôle cinétique d'un schéma biosynthétique.

L'utilisation d'éléments radioactifs permet de se rendre compte de la vraisemblance d'un schéma biosynthétique. Pour qu'une substance puisse jouer le rôle d'intermédiaire dans une chaîne métabolique, il ne suffit pas qu'elle se marque : la variation de son intensité de marquage en fonction du temps d'incubation doit répondre à un certain nombre de critères.

Supposons par exemple qu'on ait identifié un certain nombre de produits radioactifs et qu'il apparaisse logique de les relier biogénétiquement de la façon suivante :

$$B \longrightarrow C \longrightarrow D \longrightarrow E$$

Si l'on considère par exemple la transformation $B \longrightarrow C$, les molécules de C provenant de cette transformation sont immédiatement diluées par les molécules de C initialement présentes : la proportion des molécules marquées, c'est-à-dire l'activité spécifique, sera donc de plus en plus faible d'un intermédiaire à l'autre. Les relations entre les activités spécifiques sont donc les suivantes :

$$A_B^s > A_C^s > A_D^s > A_E^s$$

Ces inégalités deviennent, à la limite, des égalités : après une alimentation très longue et continue de précurseur, on a les relations :

$$A_B^S = A_C^S = A_D^S = A_E^S$$

En fait, le raisonnement que nous venons de faire est mathématique et ce qui se passe dans la cellule est probablement plus compliqué. On peut prévoir un certain nombre de phénomènes susceptibles de modifier ce schéma :

- à cause de la compartimentation cellulaire, il peut exister des masses de certains produits en dehors des sites de biosynthèse : elles ne sont alimentées en radioactivité que très lentement, leur équilibre d'activité spécifique est atteint beaucoup plus tard que celui des sites de biosynthèse. L'extraction et l'analyse chimique portent sur la quantité totale de substance extraite et l'activité spécifique expérimentale, représentant une moyenne, peut être inférieure à celle intervenant dans les transformations. Alors que la réaction C $\longrightarrow$ D se fait, il peut arriver qu'on observe une inversion du sens de l'inégalité :

$$A_C^S < A_D^S$$

- les tissus comportent des cellules d'âge différent : certaines vitesses de transformation peuvent être plus sensibles que d'autres à l'influence de l'âge.

- on ne connaît pas les vitesses d'échange entre molécules venant d'être synthétisées et molécules initialement présentes : l'effet de dilution isotopique n'est pas forcément proportionnel à la masse de substance, il dépend aussi de cette vitesse d'échange.

Cependant, il faut faire deux remarques :

- Si un intermédiaire possible a été isolé, étant présent en quantités pondérables, il apportera nécessairement une dilution d'activité spécifique et cela doit se répercuter sur la cinétique de marquage du produit suivant.

- L'étude de l'évolution des activités spécifiques en fonction du temps d'incubation (avec alimentation continue en précurseur)

permet de repérer les substances ayant un comportement anormal :

la figure 2 indique les cinétiques de marquage de B, C, et D dans le cas normal : à tout instant $A^s_B \geqslant A^s_C \geqslant A^s_D$

la figure 3 donne l'exemple d'un comportement anormal de la substance C : une partie de cette substance reçoit une alimentation lente de radioactivité, alors que l'autre partie est près de son équilibre d'activité spécifique. Dans ce cas, la comparaison des valeurs absolues des activités spécifiques n'est pas raisonnable.

Mais dans tous les cas l'effet de dilution isotopique a une répercussion sur la pente à l'origine qui doit diminuer d'un produit à l'autre ainsi, dans les deux cas cités, D ne peut être un précurseur de C.

Les relations biogénétiques seront d'autant plus difficiles à vérifier que les renouvellements sont voisins, car les pentes seront alors voisines. Dans les cas que nous avons étudiés par cette méthode, les renouvellements étaient suffisamment différents pour lever toute ambiguité.

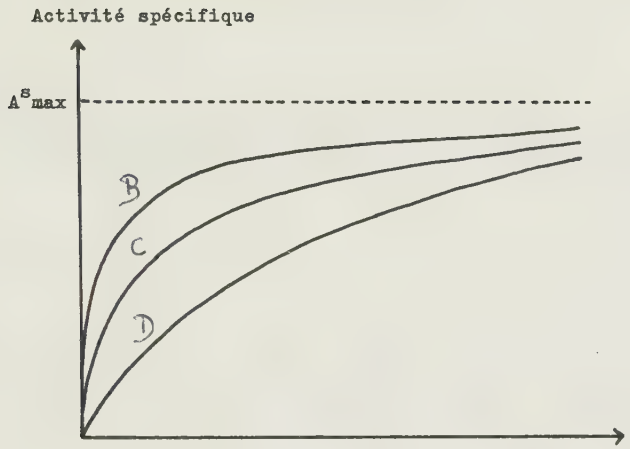


FIGURE : 2

Cas normal

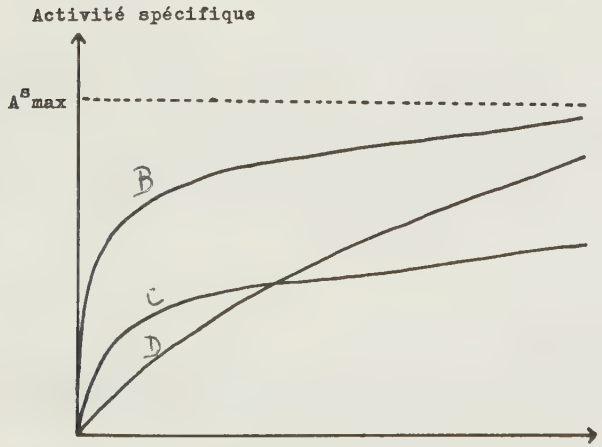


FIGURE : 3

Cas anormal

RESULTATS

I - VARIATIONS, AU COURS DE LA CROISSANCE DES COLONIES, DES TENEURS EN SCOPOLETINE ET EN SCOPOLINE DE TISSUS SAINS ET DE TISSUS VIROSES PAR LE VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC.

Au cours de cette étude, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Les teneurs en scopoline et en scopolétine des tissus de Tabac cultivés *in vitro* dépendent-elles de l'âge des cultures ? En particulier, sont-elles liées à la sénescence des colonies ?

- Ces teneurs dépendent-elles de la présence éventuelle de virus comme l'ont remarqué plusieurs auteurs dans le cas de la plante ?

- Le rapport scopoline / scopolétine est-il affecté par ces facteurs ?

Nous avons effectué les expériences de la façon suivante : après repiquage d'un lot de cultures âgées de 6 semaines, nous avons prélevé au hasard une douzaine de colonies tous les 10 jours. Chaque colonie est divisée en 3 parties équivalentes : 2 fragments sont réservés au dosage des coumarines et 1 au dosage de l'azote protéique que nous choisissons comme critère de croissance.

A. TISSUS SAINS

Les résultats obtenus après 2 expériences sur des tissus poussant sur le milieu de base (A) sont indiqués dans le tableau 5. On voit que :

- Les teneurs en scopolétine et en scopoline sont très différentes l'une de l'autre, la première ne représentant environ qu'1 à 2 % de la deuxième. Cependant, il n'y a pas de variation significative de leur rapport au cours de la croissance.

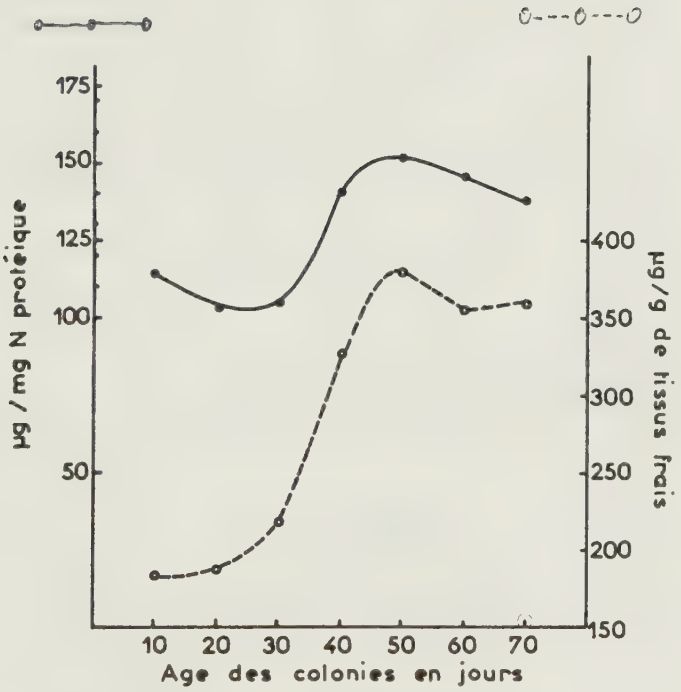


FIGURE : 4

EVOLUTION DES TENEURS EN SCOPOLINE AU COURS DE LA CROISSANCE.

TABLEAU 5

Cultures de tissus anergiés sains; deux expériences.

	Exp.	Age. 10.	20.	30.	40.	50.	60.	70.
Poids sec.	1	7,9	8,0	6,9	7,7	7,4	–	–
	2	6,0	5,4	6,4	5,5	5,5	5,8	6,1
Azote protéique.	1	530	670	580	560	520	–	–
	2	620	550	480	430	400	410	370
Scopolétine.	1	0,36	0,48	0,72	1,02	1,15	–	–
	2	0,48	0,52	0,68	0,92	0,90	0,87	0,95
Scopoline.	1	111	119	130	163	169	–	–
	2	114	103	105	141	152	146	138
Polyglucosides de scopolétine.	1	–	–	–	–	–	–	–
	2	0,20	0,18	0,38	0,90	0,91	1,5	2,2

Age des cultures : en jours.

Poids sec / en pour-cent par rapport au poids humide.

Teneur en coumarines et en azote protéique : en microgrammes par gramme de tissus frais.

Les teneurs en scopoline et en polyglucosides de scopolétine sont exprimées par rapport à l'aglucone.

TABLEAU 6

Cultures de tissus sains
poussant sur milieu de Skoog et Murashige modifié ([3]).

	Age. 10.	20.	30.	60.
Poids sec	6,4	5,3	3,6	3,6
Azote protéique	760	720	580	580
Scopolétine	1,6	1,1	2,5	6,4
Scopoline	83	87	106	168

TABLEAU 7

Cultures de tissus virosés
poussant sur milieu de Skoog et Murashige modifié ([3]).

	Age. 10.	20.	30.	60.
Poids sec	6,0	6,4	4,3	3,4
Azote protéique	770	720	700	550
Scopolétine	0,58	0,46	0,56	1,5
Scopoline				

Quels que soient les modes d'expression des teneurs en scopoline, par rapport au poids frais ou à l'azote protéique (fig. 4), elles ne commencent à augmenter nettement qu'après 30 jours de culture. On obtiendrait une courbe analogue pour la scopolétine.
La biosynthèse de ces substances semble donc la plus active pour des tissus âgés de 4 à 6 semaines : c'est pourquoi nous avons utilisé dans nos expériences de marquage des cultures repiquées depuis 5 semaines. Les dosages effectués dans ce cas ont toujours donné pour la scopolétine et pour la scopoline des valeurs voisines de celles du tableau 5.

- Les coumarines ne semblent pas s'accumuler dans les tissus âgés. Signalons cependant que les dosages faits par ailleurs sur des tissus fortement nécrosés ont permis de constater une diminution et même parfois une disparition de la scopoline, alors que les teneurs en scopolétine semblaient augmentées.

B. TISSUS VIROSES PAR LE VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC.

L'influence de l'infection des tissus de Tabac cultivés in vitro par le VMT sur les teneurs en scopolétine et en scopoline était intéressante à étudier : en effet, dans le cas de la plante entière, on observe une accumulation de ces 2 substances, ainsi que d'autres produits phénoliques (4, 11). BENVENISTE (17) avait effectué des expériences sur des tissus de Tabac poussant sur le milieu (A) : il n'avait pas constaté de différence significative entre les teneurs en scopolétine totale (obtenue par hydrolyse) des tissus sains et des tissus virosés.
Nous avons repris cette étude pour des tissus poussant sur le milieu de SKOOG et MURHSHIGE modifié et ayant subi dix passages sur ce milieu les résultats sont rapportés dans les tableaux 6 et 7. On voit que :

- Il n'y a pas de différence significative entre les teneurs en scopoline des tissus sains et des tissus virosés.

- La scopolétine libre semble être contenue en plus faibles quantités dans les tissus virosés. Cependant, cette différence n'a pas pu être confirmée au cours de dosages effectués par ailleurs.

En fait, les teneurs en scopolétine sont faibles , assez fluctuantes et modifiées par la moindre perturbation, en particulier par les variations de températures.

Les différences apparaissant entre les tableaux 6 et 7 ne sont d'ailleurs pas comparables à celles observées dans le cas des plantes : les plantes virosées sont beaucoup plus riches en scopolétine et en scopoline que les plantes saines.

Il existe donc là une différence de comportement importante entre les cultures de tissus et les plantes. Elle est peut-être due à la faible teneur en virus des cultures de tissus : en effet, des recherches récentes ont montré que les tissus anergiés cultivés in vitro contenaient 15 à 30 fois moins de virus que les tissus des plantes dont ils provenaient.

II - ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DE LA SCOPOLETINE A L'AIDE D'ELEMENTS MARQUES.

A. FORMATION DES DEUX COUMARINES A PARTIR DE PHENYLALANINE.

1) Rôle de précurseur de la L-phénylalanine

La phénylalanine et la tyrosine pouvaient a priori jouer le rôle de précurseur des deux coumarines, en particulier la deuxième qui possède déjà l'hydroxyle phénolique de la scopolétine.

Des incubations en présence de ces deux acides aminés radioactifs ont été effectuées dans des conditions identiques. Les résultats sont indiqués dans le tableau 8.

TABLEAU 8

Précurseur	Phénylalanine	Tyrosine
Absorption par les tissus	89 %	86 %
A^s scopolétine (dpm/µM)	3 000 000 ± 50 000	3 300 ± 2 000
A^s scopoline (dpm/µM)	163 000 ± 5 000	270 ± 100

La phénylalanine est donc un bon précurseur de la scopolétine ; la tyrosine, pourtant structuralement plus proche, n'est pratiquement pas utilisable. Ceci rappelle ce qui avait été constaté pour la formation des lignines (35, 36, 37, 94) et suggère que les étapes conduisant de la phénylalanine à la scopolétine ou aux lignines pourraient faire intervenir un ou plusieurs intermédiaires communs, en particulier l'acide cinnamique.

Il est bien établi maintenant que la transformation de phénylalanine en acide cinnamique se fait en une seule étape sous l'action d'une enzyme très spécifique : la phénylalanine - désaminase (38, 39).

La tyrosine est transformée en acide para-coumarique sous l'action de la tyrase, enzyme beaucoup moins répandue et décelée pour le moment uniquement dans les graminées (40, 41).

La spécificité de l'enzyme de désamination est particulièrement nette dans notre cas ; elle est ici plus élevée que dans la plupart des cas déjà décrits.

2) Cinétique de formation des deux coumarines

Le tableau 8 montre également que dans le cas du marquage à l'aide de phénylalanine, l'activité spécifique de la scopolétine libre est bien plus importante que celle de la scopoline : il est donc exclu que la forme libre provienne d'une hydrolyse du glucoside au cours de l'extraction, comme le supposent certains auteurs dans le cas de l'ombelliférone (29, 30).

Nous avons cherché à préciser les relations biosynthétiques existant entre la forme libre et le glucoside : ce dernier est-il une forme de stockage ou est-il synthétisé le premier, comme dans le cas de l'ombelliférone ? D'autre part, leur formation est-elle rapide ou lente, leur renouvellement est-il important ?

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié les variations de leur activité spécifique en fonction du temps de marquage. La figure 5 donne les résultats obtenus dans le cas d'une série de trois expériences parallèles de durées différentes effectuées sur des fragments provenant des mêmes colonies. Ces résultats ont été confirmés par dix autres marquages de durées différentes, parmi lesquels trois de cinq minutes.

Les vitesses de formation de la scopolétine et de la scopoline sont très différentes : l'activité spécifique de la forme libre augmente très vite au début ; après 45 minutes, elle croît plus lentement et presque linéairement. La courbe obtenue est typique de celle d'une substance à renouvellement rapide. Quant à la scopoline, elle se marque lentement et progressivement, sa courbe d'activité spécifique est assimilable à une droite. Même après dix heures, son activité spécifique est encore loin de l'équilibre : il s'agit d'une substance à

mC/mM

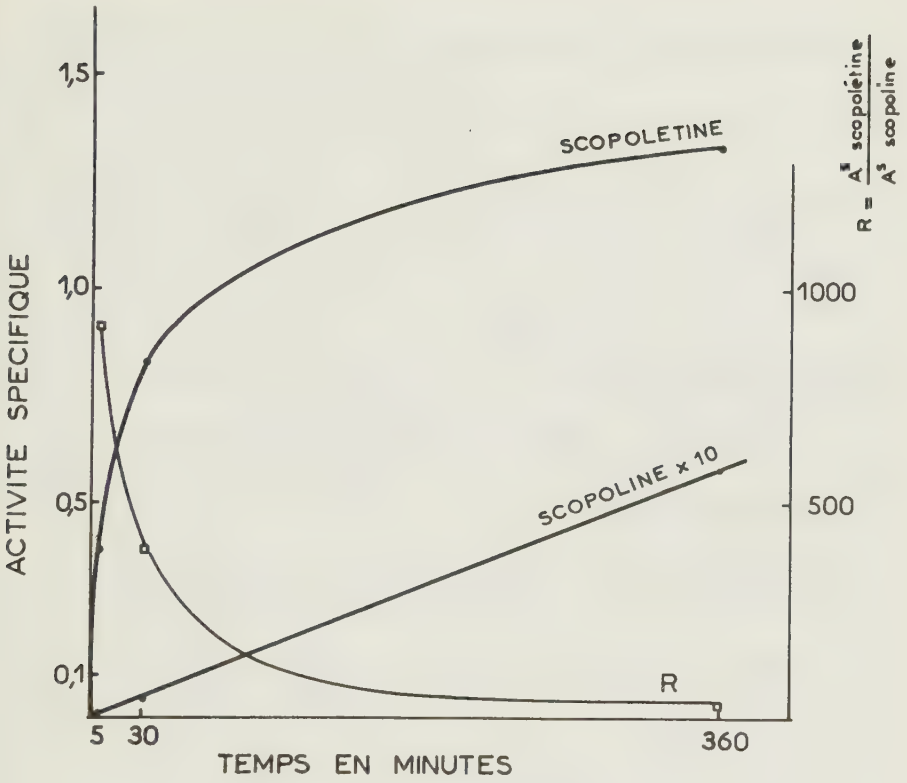


FIGURE : 5

EVOLUTION DES ACTIVITES SPECIFIQUES DE LA SCOPOLETINE ET DE LA SCOPOLINE EN FONCTION DU TEMPS DE MARQUAGE.

Les valeurs des activités spécifiques de la scopoline ont été multipliées par IO :la pente réelle de la courbe est donc IO fois plus faible.

Conditions expérimentales:

Nombre de colonies : 4 (I2 g de tissus frais)

Précurseur : 50 µC de L-phénylalanine (U)^{I4}C d'activité spécifique 200 mC/mM .

renouvellement lent. Son alimentation de radioactivité est presque constante, ce qui implique que le ou les précurseurs immédiats aient un renouvellement rapide : la scopolétine semble pouvoir jouer ce rôle.

Le schéma établi pour la biosynthèse de l'ombelliférone n'est pas valable dans notre cas, du moins en ce qui concerne les dernières étapes : l'existence d'une voie biosynthétique majeure conduisant du glucoside à la forme libre est ici exclue. D'autre part, tous les intermédiaires entre la phénylalanine et la scopolétine sont nécessairement à renouvellement très rapide : cette considération nous permettra d'éliminer toute une série d'intermédiaires *a priori* possibles.

Cette étude cinétique n'a été possible que parce que nous avons utilisé des temps de marquage très courts et des activités spécifiques élevées du précurseur. La courbe du rapport des activités spécifiques scopolétine / scopoline montre,qu'après un certain temps, l'alimentation de radioactivité de la scopolétine sera inférieure à celle de la scopoline : à l'équilibre, c'est-à-dire après des temps longs, le rapport d'activité est le même que celui de leur concentration et le rapport d'activité spécifique doit être voisin de l'unité : nous aurions pu conclure à un schéma analogue à celui de l'ombelliférone.

Pour essayer de comprendre leur rôle biologique, nous avons calculé le flux de radioactivité de chacune des coumarines à l'aide des courbes d'activité spécifique. Ces flux sont respectivement de 6000 dpm/mn pour la scopolétine et de 600 dpm/mn pour la scopoline. Ils correspondent à 5×10^{-1} ug/mn et à 5×10^{-2} ug/mn de flux de matière. Si on admet que la première est le précurseur de la deuxième, cette transformation ne représente au plus qu'un dixième du catabolisme de la scopolétine. De plus, la biosynthèse de la scopoline est alors du même ordre de grandeur que celle qu'on peut calculer d'après les courbes de croissance (tableau 4 et figure 4) : le glucoside apparaît donc comme une forme de stockage, son catabolisme est peu important.

En ce qui concerne le flux de radioactivité à travers la scopolétine, un dixième au plus correspond à la croissance, un dixième au plus est utilisé dans la formation du glucoside, il y a donc un grand

défaut de radioactivité : le catabolisme de la scopolétine est très important.

Il est bien connu que la scopolétine est, in vitro, l'un des inhibiteurs les plus puissants de l'I.A.A. oxydase, contrairement à la scopoline (42). Le catabolisme que nous constatons dans les tissus de Tabac rend compatible un rôle analogue in vivo. Cependant, s'il est certain qu'on peut envisager son rôle in vitro comme protecteur de l'I.A.A., il ne faut pas oublier que, in vivo, les concentrations de scopolétine sont beaucoup plus importantes que celles de l'I.A.A. : est-il raisonnable alors de penser à une oxydation compétitive ? Il est vrai que la compartimentation cellulaire peut encore là fausser des données obtenues sur les tissus entiers,et rendre vraisemblable ce rôle de protecteur de l'auxine.

B. RECHERCHE D'INTERMEDIAIRES DANS LA BIOSYNTHESE DE LA SCOPOLETINE ET DE LA SCOPOLINE.

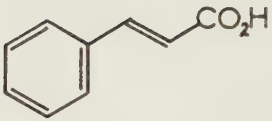
1. Mise en évidence de dérivés de l'acide cinnamique après hydrolyse.

La spécificité de la biosynthèse de la scopolétine vis-à-vis de la phénylalanine suggèrait le rôle d'intermédiaire de l'acide cinnamique : la structure de cette substance est compatible avec ce rôle puisque le squelette carboné est le même que celui de la scopolétine. Nous avons alors essayé d'identifier l'acide cinnamique et ceux de ses dérivés dont les substituants étaient compatibles avec un rôle d'intermédiaire. Le tableau 9 indique les produits cherchés et ceux qui ont été identifiés. Précisons que cette identification a été faite après saponification et hydrolyse acide : les produits isolés correspondent chacun à un mélange de formes solubles dans le méthanol. La distribution de radioactivité dans chacun d'eux après 4 heures de marquage est indiquée sur la figure 6.

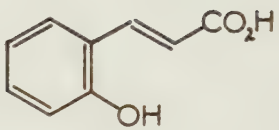
L'absence des acides ortho- et méta-coumariques confirme une observation déjà faite (36) : les hydroxylations du noyau aromatique se font suivant un ordre déterminé :

acide cinnamique ⟶ acide para-coumarique ⟶ acide caféique

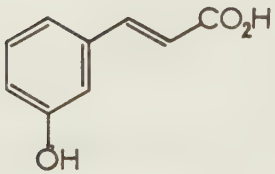
TABLEAU 9



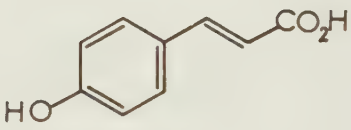
6 Acide cinnamique



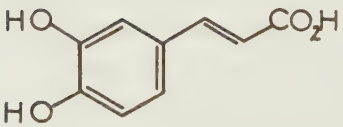
8 Acide ortho-coumarique



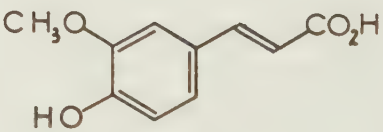
9 Acide méta-coumarique



7 Acide para-coumarique



IO Acide caféique



II Acide férulique

Les produits dont les noms sont soulignés ont été identifiés dans notre matériel .

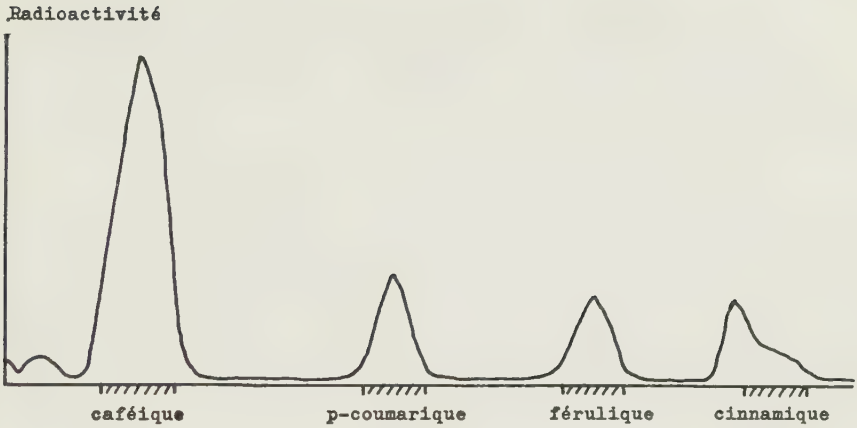


FIGURE ; 6

REPARTITION DE RADIOACTIVITE DANS LA FRACTION ACIDE EXTRAITE AU BICARBONATE DE SODIUM.

En ordonnée : l'indication donnée par un lecteur de radioactivité

En abcisse :la position des substances après chromatographie sur papier avec le solvant:benzène/acide acétique/eau (6/7/3)

Conditions expérimentales :

nombre de colonies : 5 (15 g frais)

précurseur : 50 µC de phénylalanine d'activité spécifique 80 mC/mM .

durée d'incubation : 4 heures

2. Identification des différentes formes des acides cinnamique et hydroxycinnamiques.

On peut s'attendre à l'existence de quatre classes de formes dans les tissus :

- les acides-phénols libres
- les esters : leur fonction phénol reste libre
- les glucosides de phénol : leur fonction acide reste libre
- les glucosides estérifiés : les deux fonctions sont engagées dans des liaisons.

Nous n'avons pas trouvé de glucosides estérifiés ; par contre, les autres formes sont présentes.

a) les acides-phénols libres.

Les formes libres n'ont pratiquement jamais été identifiées de façon nette, car elles existent en très faibles quantités dans tous les cas. Malgré leur fluorescence caractéristique, nous n'avons jamais pu les mettre en évidence en nature, même en extrayant plus de 20 colonies. Par contre, nous avons pu déceler leur radioactivité après marquage à la phénylalanine et montrer que cette radioactivité était liée aux produits entraîneurs ajoutés. Cette identification n'a été possible qu'en utilisant de la phénylalanine marquée d'activité spécifique suffisante (plus de 100 mC/mM). Nous nous sommes assurés que le processus expérimental employé excluait toute trace d'hydrolyse des formes liées.

Les quatre acides identifiés précédemment après hydrolyse sont présents dans les tissus sous forme libre : acides cinnamique, para-coumarique, caféique, férulique.

b) les esters.

L'identification de ces produits a été facilitée par les nombreux travaux déjà décrits, et donnant les propriétés physiques et chimiques de ces substances (43-47). Nous nous sommes d'autre part inspirés d'un travail analogue effectué sur un matériel voisin du nôtre (48). Les esters peuvent être divisés en trois catégories :

- les esters d'acide quinique (12)

Les quatre esters attendus ont été identifiés. Parmi eux, seul l'acide caféoylquinique est présent en quantités importantes : 0,5 mg/g de tissu sec. Nous n'avons décelé les autres que par marquage radioactif.

- les esters d'acide shikimique (14)

Nous avons isolé une forme d'acide férulique dont les propriétés sont identiques à celles d'un produit identifié par THIES (48) comme étant l'acide féruloylshikimique ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$). Cette substance n'a été que rarement signalée (50). Dans notre matériel, c'est la forme liée prédominante en ce qui concerne l'acide férulique.

- les esters de glucose (13)

Ces produits sont les formes conjuguées les plus répandues dans les plantes. Nous avons identifié les esters de glucose d'acide cinnamique ($R_1 = R_2 = H$), d'acide para-coumarique ($R_1 = H$; $R_2 = OH$) et d'acide férulique ($R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$). Seul ce dernier a pu être mis en évidence : sa teneur dans les tissus représente environ le tiers de celle de l'acide féruloylshikimique. Les deux autres ont été décelés par marquage radioactif.

Les esters de glucosamine identifiés par THIES (48,49) ne sont présents dans notre matériel qu'à l'état de traces.

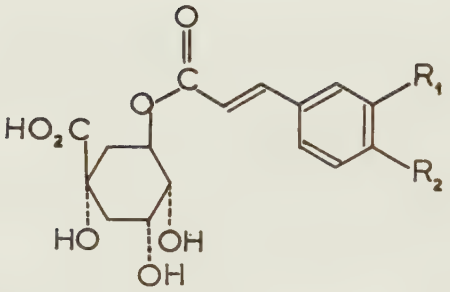
c) les glucosides de phénols

RUNECKLES (50) a identifié dans les feuilles de Tabac une grande variété de glucosides. Dans notre matériel, nous n'avons décelé de façon nette que le glucoside d'acide férulique, grâce à ses propriétés physiques et à son marquage radioactif. Précisons que THIES n'a trouvé aucun glucoside d'acide hydroxycinnamique dans certains clones de Tabac (48).

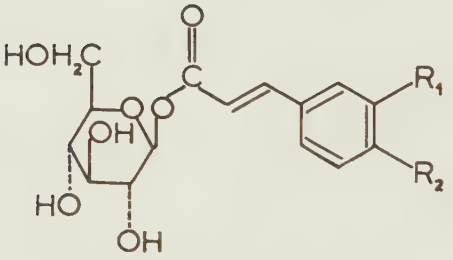
Enfin, les polymères insolubles dans le méthanol, identifiés dans le blé (51, 52) et susceptibles d'être des intermédiaires dans la biosynthèse des lignines, ne sont pas présents dans notre matériel. Par saponification, ils donnent des dérivés de l'acide cinnamique. Le tableau 11 indique les radioactivités obtenues pour toutes les formes solubles dans le méthanol et pour les autres traitées comme dans le

TABLEAU IO

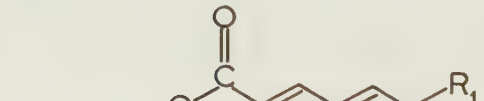
Esters



I2 Esters d'acide quinique



I3 Esters de glucose



I4 Ester d'acide shikimique

cas du blé (51, 52). La totalité de l'activité se trouve dans les formes solubles.

Parmi les formes liées identifiées, deux nous paraissent particulièrement importantes :

- d'une part, le glucoside d'acide férulique qui, si l'on se réfère au schéma biosynthétique de l'ombelliférone (tableau 3) pourrait être le précurseur de la scopoline.
- d'autre part, l'ester quinique d'acide caféique qui est la forme liée la plus abondante dans notre matériel et dont le rôle dans les phénomènes de défense et de croissance semble analogue à celui de la scopolétine (11, 42).

TABLEAU II

Radioactivités des formes solubles et insolubles dans le méthanol.

aglucone	Extrait méthanolique	Tissus après extraction
Acide p-coumarique	$4{,}62 \times 10^5$	I 350
Acide caféique	$2{,}22 \times 10^6$	3 300
Acide férulique	$4{,}96 \times 10^5$	I650

Radioactivités : exprimées en dpm .

Conditions expérimentales :

nombre de colonies : 5 (I5 g frais)

précurseur : 30 µC de phénylalanine d'activité spécifique 80 mC/mM .

durée d'incubation : I0 heures

3. Cinétique de formation des acides-phénols cinnamiques à partir de phénylalanine

Une "impulsion" de trois minutes a été effectuée à l'aide de phénylalanine marquée : nous voulions comparer les vitesses de formation des composés cinnamiques à celles des deux coumarines. Le tableau 12 indique les activités spécifiques obtenues.

TABLEAU 12

Radioactivités spécifiques des acides-phénols et des coumarines après trois minutes d'incubation .

Substances	Activités spécifiques (dpm/µM)
Acide para-coumarique	60 000
Acide caféique	16 000
Acide férulique	10 300
Scopolétine	93 000
Scopoline	900

Conditions expérimentales :

Nombre de colonies : 5 (15 g de poids frais)
Précurseur : 100 µC de phénylalanine (U) ^{14}C d'activité spécifique 200 mC/mM .

L'activité spécifique des acides-phénols a été déterminée après hydrolyse de l'ensemble de leurs formes conjuguées .

Le tableau 12 permet de tirer deux conclusions :

- Les transformations sur le noyau aromatique sont très rapides puisqu'après trois minutes d'incubation leurs activités spécifiques sont du même ordre de grandeur.

- L'activité spécifique de la scopolétine est supérieure à celle des acides-phénols : ceci semble incompatible avec un rôle de précurseur de ces derniers. En fait les activités spécifiques des acides-phénols ont été déterminées après hydrolyse du résidu méthanolique. Il s'agit donc d'une valeur moyenne portant sur le mélange des formes précédemment identifiées : on en déduit que si les acides sont des intermédiaires dans la biosynthèse de la scopolétine, toutes leurs formes n'y interviennent pas.

Pour trouver des intermédiaires cinétiquement possibles, il fallait étudier le renouvellement de toutes ces formes.

a) Renouvellement des formes libres et des formes liées.

La figure 7 indique la répartition de la radioactivité dans les formes libres et liées après un marquage à la phénylalanine de 40 minutes. Les produits ne peuvent être visualisés que dans le cas des formes liées. D'autre part si l'on augmente la durée d'incubation, les radioactivités des formes libres restent les mêmes. Par contre celles des formes liées augmentent beaucoup, en particulier celles de l'acide caféique et de l'acide férulique, produits les plus abondants. La situation est analogue à celle trouvée pour les coumarines : les formes libres ont un renouvellement beaucoup plus important que les formes liées. Ce sont ces dernières qui apportent une forte dilution isotopique et qui sont responsables des inversions d'activité spécifique constatées précédemment, et cela se trouve confirmé par les résultats du tableau 13.

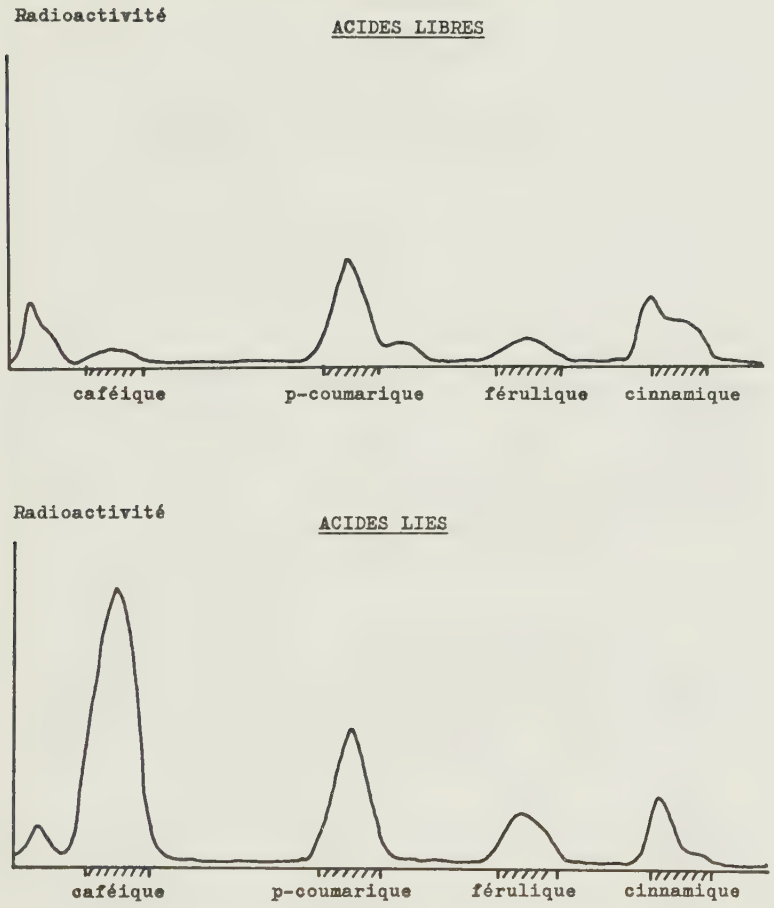


FIGURE : 7

DISTRIBUTION DE RADIOACTIVITE DANS LES ACIDES LIBRES ET LIES APRES UN MARQUAGE DE PHENYLALANINE DE 40 MINUTES.

Conditions expérimentales:

Nombre de colonies : 10 (30 g de poids frais)

Précurseur : 60 µC de phénylalanine d'activité spécifique 200 mC/mM .

TABLEAU I3

Radioactivités spécifiques des coumarines et de certaines formes d'acides-phénols après 40 minutes d'incubation .

Substances	Activités spécifiques (mC/mM)
Scopolétine	0,72
Scopoline	0,0038
Acide p-coumarique libre	8,I
Ester caféoylquinique	0,45
Ester féruloylglucose	0,I3
Ester féruloylshikimique	0,036
Acide glucosidoférulique	0,08I

Les acides libres atteignent rapidement leur équilibre d'activité spécifique, la valeur trouvée pour l'acide para-coumarique libre est donc du même ordre de grandeur que celles de l'acide caféique et de l'acide férulique. L'ensemble de ces résultats montre que :

- Seuls les acides-phénols libres sont des intermédiaires possibles entre la phénylalanine et la scopolétine ; quant à la scopoline, elle peut avoir comme précurseur l'acide glucosidoférulique.
- Les formes libres sont de très bons substrats pour les transformations sur le noyau aromatique.

- Les formes liées ont des renouvellements très variables ; le plus lent est celui de l'ester féruloylshikimique qui apporte la dilution isotopique la plus importante au niveau de l'acide férulique.

b) Les réactions d'estérification et de glucosidation : leur spécificité, leur rôle.

Les renouvellements de certaines formes liées sont néanmoins assez importants : par exemple ceux de l'ester féruloylglucose et surtout de l'ester caféoylquinique, substance la plus abondante. Il est exclu qu'il s'agisse de formes de stockage comme la scopoline. On peut alors se demander quel est leur rôle dans les tissus.

Les travaux concernant l'identification et la biosynthèse des esters, en particulier des esters d'acide quinique, sont très nombreux. Ces substances passent pour être les véritables substrats des hydroxylations successives sur le noyau aromatique, c'est-à-dire qu'elles seraient reliées biogénétiquement de la façon suivante (44) :

acide cinnamoylquinique ⟶ acide p-coumaroylquinique ⟶ acide caféoylquinique.

On ne peut rejeter un schéma de ce type, cependant il n'a pas été prouvé de façon indiscutable : les méthodes essayées pour déceler les formes libres manquent de sensibilité. D'autre part les quantités très importantes de substances administrées lors des expériences de marquage (44) entraînent inévitablement des déviations de métabolisme et des réactions de détoxification.

— En fait l'estérification et la glucosidation ne sont pas des réactions spécifiques : ainsi, après administration d'acide hydroxy-2 férulique; substance non présente dans notre matériel, nous avons observé la formation d'une quantité importante de son ester de glucose.

Nous pensons que les formes liées sont synthétisées surtout à partir des acides libres correspondants (53) et qu'il s'agit de substances d'équilibre. Un certain nombre d'expériences décrites sont en faveur de cette hypothèse. Ainsi BERGMANN(54) ne parvient pas à déceler d'acide cinnamique, sous quelque forme que ce soit, dans un matériel voisin du nôtre. S'il administre de l'acide cinnamique libre, des quantités décelables d'esters se forment. D'autre part ASEN et EMSWELLER (55) constatent que des plantules d'un hybride (Lilium auratum x L. speciosum) sont tumorales et meurent peu après le début du développement; car 60 % de l'acide férulique contenu se trouve sous forme libre. Dans un autre hybride (L. speciosum "Album" x L. speciosum "Rubrum")

l'acide férulique est présent surtout sous forme d'esters et les plantules se développent normalement.

De notre côté, nous avons étudié l'influence d'un prétraitement à l'acide férulique libre sur la biosynthèse des acides-phénols. La répartition de radioactivité des formes libres et des formes liées est indiquée sur les figures 8 et 9 : des différences spectaculaires apparaissent dans le cas des formes conjuguées dont les marquages sont beaucoup plus faibles. Les résultats sont les suivants :

- Les transformations sur le noyau aromatique se sont faites puisque les marquages des acides libres sont normaux, l'acide p-coumarique est même nettement plus marqué.

- Le tableau 14 montre que les radioactivités des formes liées sont nettement moins élevées, quelle que soit leur classe (esters quinique, esters de glucose, glucoside).

- Cependant, la quantité des formes conjuguées d'acide férulique est 2 à 3 fois plus élevée : il y a donc eu biosynthèse mais non marquage de ces dernières substances.

Nous proposons l'explication suivante : la présence de doses anormales d'acide férulique dans les tissus a entraîné une synthèse très importante des formes conjuguées de cet acide. Il y a eu une sorte de "saturation" des enzymes responsables de ces réactions et par conséquent un ralentissement de la biosynthèse des formes liées des autres acides-phénols. La diminution observée de radioactivité est donc due à deux phénomènes différents :

- Les estérifications des acides cinnamique, para-coumarique caféique ne se sont pratiquement pas faites.

- La biosynthèse des formes conjuguées de l'acide férulique a été plus vive mais la dilution isotopique due aux importantes quantités d'acide libre exogène est responsable des faibles activités décelées.

Ces réactions d'estérification et de glucosidation semblent donc être soumises à une régulation.

Remarquons également la sensibilité de ce matériel végétal vis-à-vis de l'administration de quantités assez importantes de substance : les perturbations métaboliques dont nous avions noté la possibilité sont ici très nettes.

TABLEAU I4

Influence de la préincubation d'acide férulique sur la radioactivité (en dpm) obtenue dans les acides-phénols .

Substances	Expérience témoin	Expérience F
Acide p-coumarique libre	240 000	800 000
Acide caféique libre	2I 000	24 000
Acide férulique libre	50 000	50 000
Ester p-coumaroylquinique	2I0 000	45 000
Ester p-coumaroylglucose	55 000	6 000
Ester caféoylquinique	I400 000	50 000
Ester féruloylglucose	60 000	I 800
Acide glucosidoférulique	25 000	I 500

ACIDES LIBRES

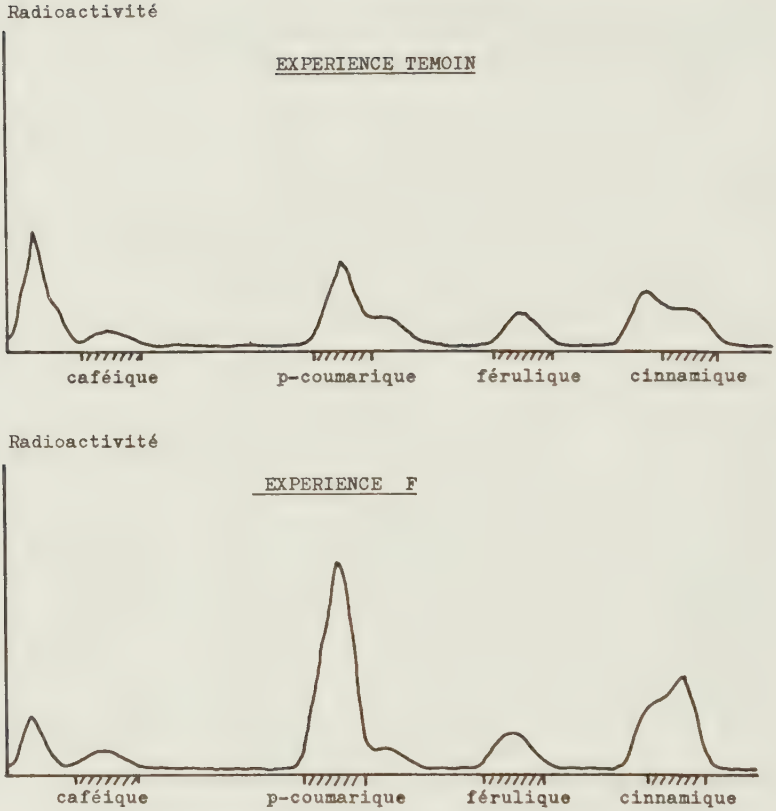


FIGURE : 8

Conditions expérimentales :

Expérience F : 1ère incubation en présence d'une solution 0,002M d'acide férulique non radioactif (durée : 4 heures)

2ème incubation en présence de 60 µC de phénylalanine d' activité spécifique 200 mC/mM (durée : 40 minutes)

Expérience témoin : le prétraitement est fait sans acide férulique. Les autres conditions sont identiques.

ACIDES LIES

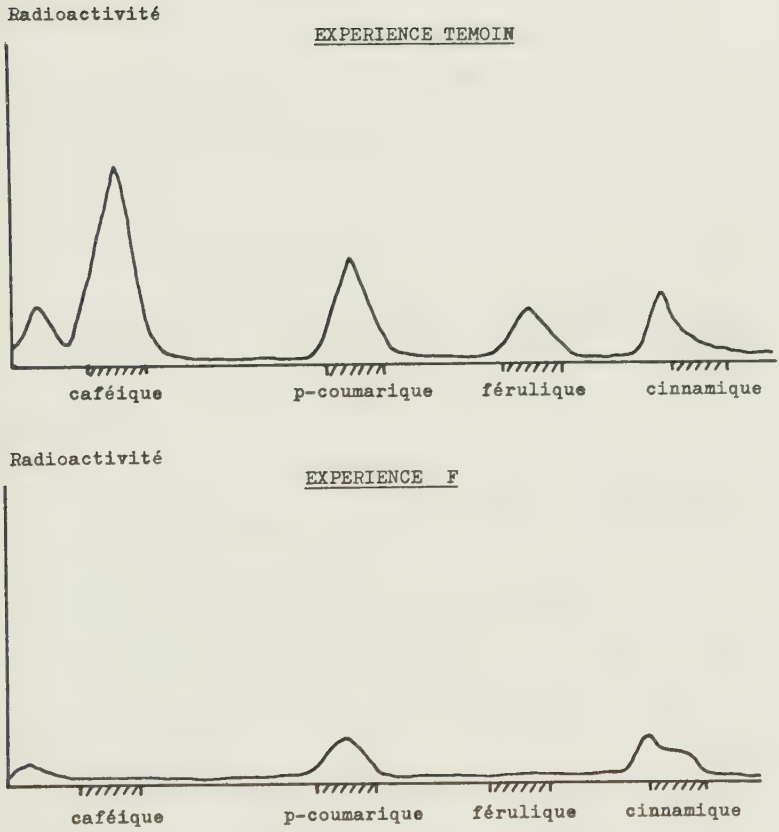


FIGURE : 9

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles de la figure 8 .

C - Etude des différentes étapes de la biosynthèse de la scopolétine et de la scopoline

1. Etapes antérieures à la méthylation

a) Rôle de l'acide cinnamique

Dans toutes nos expériences de marquage à la phénylalanine, la radioactivité trouvée dans l'acide cinnamique a été faible, tout juste décelable. Or cette substance devrait être nettement marquée puisqu'elle est placée immédiatement après le précurseur dans la chaîne métabolique classique. D'autre part, THIES n'a pas trouvé ce produit dans des clones de Tabac, ni pondéralement ni par marquage à la phénylalanine. Il conclut que la transformation de phénylalanine en substances hydroxylées possédant le squelette du phénylpropane ne se fait pas par l'intermédiaire de l'acide cinnamique, mais par l'acide parahydroxyphénylpyruvique qui donnerait ensuite l'acide para-coumarique.

La non-utilisation de la tyrosine pour la biosynthèse des coumarines rend probable le rôle d'intermédiaire de l'acide cinnamique dans le cas de notre matériel ; cependant, nous avons voulu le prouver de façon indiscutable.

Le rôle d'intermédiaire n'est compatible avec la faible radioactivité trouvée que si le renouvellement est très important, de sorte que l'activité spécifique soit élevée. D'autre part, si on administre aux tissus de l'acide cinnamique marqué et si ce produit est un intermédiaire, toutes les formes d'acides-phénols et les coumarines doivent se marquer : les marquages relatifs observés doivent être analogues à ceux obtenus après une incubation à l'aide de phénylalanine de même durée.

Renouvellement de l'acide cinnamique

Pour montrer le renouvellement important de l'acide cinnamique, nous avons essayé d'accumuler la radioactivité dans ce produit après marquage à la phénylalanine. Deux méthodes ont été utilisées : incubations in vivo et in vitro.

- Incubations in vivo

La désamination de la phénylalanine est une étape anaérobie ; par contre, les hydroxylations successives nécessitent de l'oxygène. En effectuant une incubation sous azote en présence de phénylalanine marquée, on pouvait espérer bloquer ces réactions d'hydroxylations et par conséquent accumuler l'acide cinnamique. La figure 10 montre la répartition de radioactivité dans les acides-phénols : il y a bien un

FIGURE : IO

INCUBATION ANAEROBIE EN PRESENCE DE PHENYLALANINE MARQUEE.

Conditions expérimentales :

nombre de colonies: 5 (I5 g de tissus frais)
durée d'incubation : 3 heures.
précurseur : 30 μC de phénylalanine DL d'activité spécifique I7 mC/mM .

Les substances ont été isolées après hydrolyse.

peu d'activité au niveau de l'acide para-coumarique (l'anaérobiose n'a pas été parfaite), mais on observe effectivement une forte accumulation de radioactivité au niveau de l'acide cinnamique. Précisons que ce pic de radioactivité contient la même contamination que celle indiquée sur tous les diagrammes précédents et qui est due à un produit chromatographiquement identique à l'acide phénylacétique : mais, dans le cas de la figure 10 cette contamination est peu importante. D'autre part, aucun marquage n'est décelable dans les coumarines.

Cette expérience a été répétée et suivie d'un court "chassage": après l'incubation anaérobie, nous avons laissé entrer de l'air dans le ballon pendant 15 minutes, mais sans agitation. Le diagramme de radioactivité obtenu est donné sur la figure 11 : l'activité de l'acide cinnamique est encore très élevée, mais cette fois, on observe un marquage net de l'acide para-coumarique.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'accumuler l'acide cinnamique et que sa transformation en acide para-coumarique est rapide.

- Incubations avec un système enzymatique

La phénylalanine-désaminase est une enzyme soluble (56). Elle est donc contenue dans la fraction obtenue à partir d'un système acellulaire de tissus de Tabac par centrifugation à 100.000 g. L'isolement de cette fraction a déjà été décrit en détail (57) : nous l'avons examiné au point de vue de l'activité de la phénylalanine-désaminase.

Le diagramme de radioactivité obtenu est indiqué sur la figure 12 : seul l'acide cinnamique est marqué. La fraction testée ne permet pas d'hydroxyler le noyau aromatique et nous constatons encore une fois une accumulation d'acide cinnamique : la radioactivité mesurée est 3000 fois plus élevée que celle qu'on décèlerait après une incubation aérobie in vivo avec le même nombre de colonies et le même précurseur.

Ces résultats montrent que l'acide cinnamique est effectivement présent dans les tissus de Tabac cultivés in vitro et qu'il s'agit d'une substance à renouvellement très rapide.

Utilisation de l'acide cinnamique par les tissus de Tabac cultivés in vitro.

Une incorporation directe d'acide cinnamique marqué dans les acides-phénols et dans les coumarines a été tentée. Nous désirions étudier son efficacité et sa spécificité de précurseur.

FIGURE : II

INCUBATION ANAEROBIE EN PRESENCE DE PHENYLALANINE MARQUEE ,
PUIS CHASSAGE .

Conditions expérimentales : les mêmes que pour la figure IO .
Chassage : introduction d'air pendant 20 minutes.

Les produits ont été isolés de la même façon que précédemment.

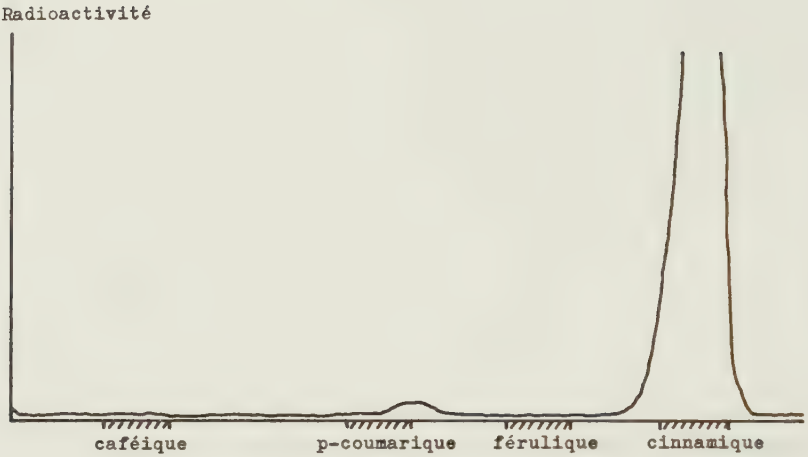


FIGURE : I2

INCUBATION D'UN SURNAGEANT $S_{100\ 000}$ EN PRESENCE DE PHENYLALANINE MARQUEE.

Fraction acide extraite au bicarbonate de sodium

Conditions expérimentales:

nombre de colonies homogénéisées : 10

pH d'incubation : 8,8

durée d'incubation : 2 heures

température : 35° C

précurseur: 10 µC de phénylalanine d'activité spécifique 80 mC/mM

- Préparation de l'acide cinnamique radioactif

Nous avons utilisé deux méthodes de préparation, l'une chimique, l'autre biosynthétique.

.Méthode chimique :

Cette méthode, commune à tous les produits cinnamiques, est basée sur la réaction schématisée sur la figure 13.

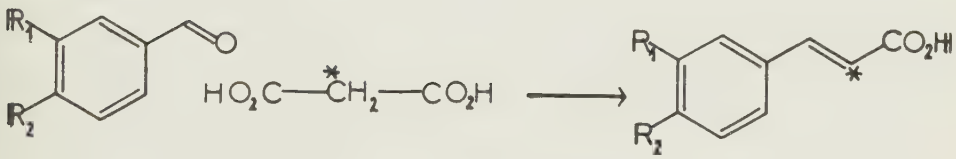


FIGURE : 13

Synthèse des produits cinnamiques marqués

.Méthode biosynthétique :

Il est possible d'accumuler l'acide cinnamique à l'aide de l'une ou l'autre des méthodes décrites ci-dessus. En fait, l'utilisation d'un système enzymatique est la plus commode. Elle nous a permis d'obtenir 1 µC d'acide cinnamique marqué à partir de 30 colonies et de 20 µC de phénylalanine d'activité spécifique 200 mC/mM. La spécificité du marquage obtenu est identique à celle du précurseur.

- Résultats

Deux méthodes d'incubation (milieu liquide ou milieu solide) ont été essayées ; celle utilisant des boîtes de Pétri a été la plus satisfaisante. Nous donnons dans ce qui suit les résultats de la meilleure expérience.

La distribution de radioactivité dans les acides-phénols est indiquée sur la figure 14. Les marquages obtenus sont rapportés dans les tableaux 15 et 16.

Ces résultats montrent que :

- L'acide cinnamique est un précurseur efficace et spécifique des acides-phénols cinnamiques et des coumarines. La spécificité est montrée par les rendements d'incorporation assez élevés dans les produits étudiés (49 % de l'activité métabolisée). Vu la durée d'incubation et le renouvellement important de certaines de ces substances, une radioactivité non négligeable doit déjà se trouver dans leurs produits de catabolisme. Quant à l'efficacité du précurseur, elle est mise en évidence non seulement par les rendements d'incorporation élevés mais aussi par la faible dilution isotopique trouvée dans la scopolétine : elle est 8 fois plus faible que celle trouvée à partir de phénylalanine marquée.

- La distribution relative de radioactivité dans les acides-phénols et dans les coumarines est analogue à celle qu'on observe pour un marquage de phénylalanine de même durée. En particulier le rapport des activités spécifiques de la scopolétine et de la scopoline est très voisin de celui qu'on obtient à partir de la courbe de la figure 5, courbe obtenue expérimentalement en étudiant les cinétiques de marquage à partir de phénylalanine. On peut toutefois remarquer une activité plus forte que d'habitude dans les formes liées d'acide cinnamique. Ce résultat confirme les constatations faites précédemment : les quantités d'acide cinnamique administrées étant plus fortes que celles contenues normalement dans les tissus, la synthèse des formes liées correspondantes a été augmentée.

L'acide cinnamique est donc bien un intermédiaire dans la biosynthèse des acides-phénols et des coumarines à partir de phénylalanine.

b) Les hydroxylations sur le noyau aromatique

Les tissus de Tabac cultivés in vitro sont donc capables de transformer l'acide cinnamique en acide para-coumarique et en acide caféique. Les deux hydroxylations se font probablement suivant un ordre spécifique : d'abord en para, puis en méta, comme semble le montrer le travail de McCALLA et NEISH (36). Les systèmes enzymatiques catalysant les deux transformations ont été beaucoup étudiés durant ces dernières années ; nous résumons très brièvement les résultats obtenus.

La conversion in vitro d'acide cinnamique en acide para-

TABLEAU I5

Marquage des acides-phénols.

Substances		Radioactivités (dpm)	Rendements d'incorporation (%)
Acides libres	p-coumarique	42 000	6,0
	caféique	5 200	0,7
	férulique	8 200	I,2
Acides liés	p-coumarique	65 000	9,3
	caféique	I35 000	I9,4
	férulique	58 000	8,3

TABLEAU I6

Marquage des coumarines .

	Scopolétine	Scopoline	Scopolétine / Scopoline
Radioactivités totales (dpm)	I0 000	I8 500	0,54
Rendements d'incorporation (%)	I,4	2,6	-
Activités spécifiques (dpm/µM)	II6 000	2 250	5I
Dilutions isotopiques	20	I 000	

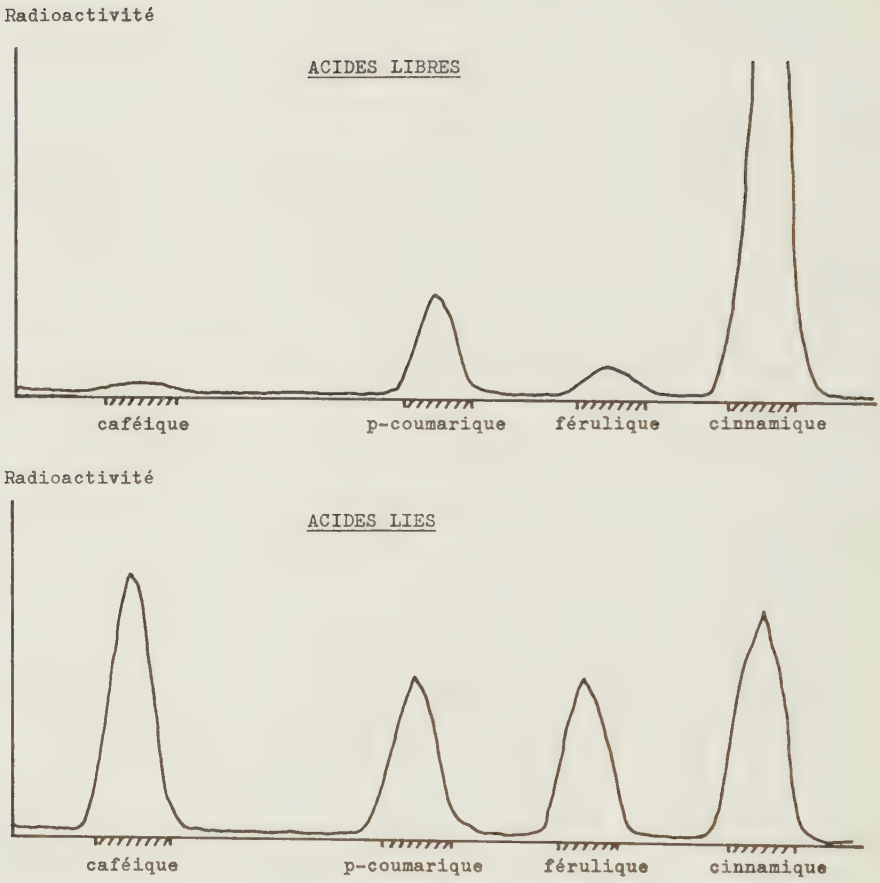


FIGURE : I4

DISTRIBUTION DE RADIOACTIVITE DANS LES ACIDES-PHENOLS APRES UN MARQUAGE A L'ACIDE CINNAMIQUE 2-C^{14} DE 3h30mn .

Conditions expérimentales:

Nombre de colonies : 8 (22 g frais)

Précurseur : 0,5 µC d'acide cinnamique d'activité spécifique I mC/mM .

Quantité de précurseur métabolisée par les tissus : 56 %

coumarique a déjà été réalisée à l'aide d'une poudre acétonique obtenue à partir de feuilles d'épinard (58). La purification de l'enzyme est difficile car elle ne semble pas très stable. Des résultats récents suggèrent qu'il s'agit d'une enzyme particulaire (59). La deuxième hydroxylation, aboutissant à l'acide caféique, est mieux connue. Elle a souvent été réalisée in vitro et semble catalysée par une phénolase.

Ces hydroxylations se font sur les formes libres et sur les formes liées ; dans notre cas principalement sur les premières. Il faut remarquer que le rôle de substrat des formes liées n'a été mis en évidence de façon nette que grâce à des systèmes in vitro, ce qui ne permet pas de connaître leur importance in vivo. THIES (48) a préparé, à partir de clones de Tabac, un système acellulaire capable de transformer l'acide para-coumarique libre en acide caféique et l'acide para-coumaroylquinique en acide caféoylquinique ou chlorogénique.

Cette dernière substance nous intéresse particulièrement : malgré son abondance, elle a un renouvellement important. Nous avons comparé sa vitesse de formation à celle de la scopolétine : tableau 17. Les cinétiques de formation sont un peu différentes : il y a une sorte de latence dans la biosynthèse de l'acide chlorogénique. Puis son activité spécifique croît très vite et se rapproche de celle de la scopolétine malgré un rapport des concentrations de 50. Ceci montre que l'acide chlorogénique n'est pas un précurseur de la scopolétine, mais que son catabolisme doit être considérable (60, 61). Nous nous proposons de l'étudier car cette substance est, comme la scopolétine, un inhibiteur puissant de l'I.A.A. oxydase in vitro.(42, 62).

TABLEAU 17

Activités spécifiques / Temps de marquage	A^S acide chlorogénique	A^S scopolétine	$\frac{A^S \text{ ac.chlor.}}{A^S \text{ scopol.}}$
5 minutes	0,034	0,29	0,12
40 minutes	0,45	0,72	0,63

Les activités spécifiques sont exprimées en mC/mM.

2. Les étapes de méthylation et de cyclisation

La scopolétine comporte un groupement méthoxy de plus de l'om belliférone : cela augmente le nombre d'intermédiaires possibles. A partir d'acide caféique, deux schémas biosynthétiques au moins paraissent raisonnables, l'un faisant intervenir l'acide férulique, l'autre l'esculétine. Pour choisir entre ces deux possibilités, il faut répondre à la question suivante : la méthylation précède-t-elle ou suit-elle la cyclisation ? (figure 15)

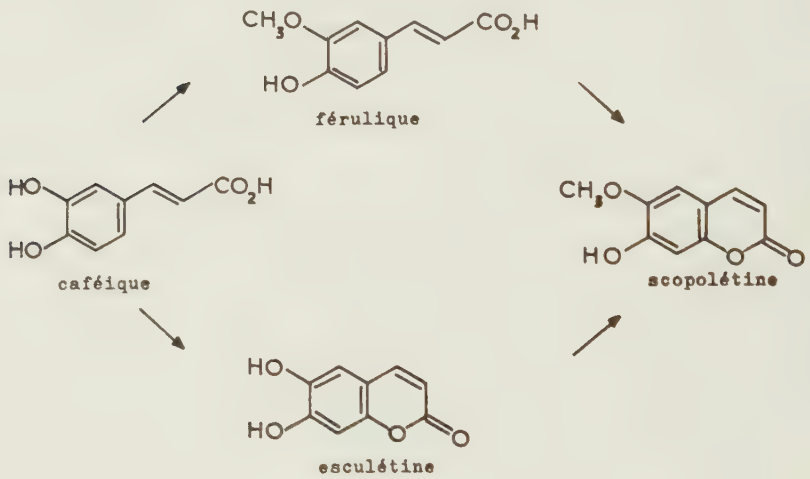


FIGURE : 15

Schémas biosynthétiques possibles conduisant de l'acide caféique à la scopolétine .

a) Recherche de l'esculétine

On connaît des systèmes enzymatiques capables de méthyler l'esculétine en scopolétine (63,65). D'autre part, l'esculétine a été décelée dans la plante de Tabac (66, 67).

Nous avons alors cherché à identifier ce produit dans notre matériel.

Sa recherche se complique du fait de la transformation chimique facile d'acide caféique en cette coumarine (64,68,69). La moindre manipulation de l'acide caféique se traduit, après chromatographie, par l'apparition d'une tache d'esculétine. Pour mettre ce produit en évidence, il faut le séparer de l'acide caféique au cours de la première étape de la purification, précaution qui n'a pas toujours été prise par les auteurs l'ayant "identifié".

En opérant ainsi, nous n'avons pas pu trouver l'esculétine, ni par fluorescence, ni par marquage à la phénylalanine.

Il pouvait s'agir d'une substance à renouvellement très rapide. Une préincubation des tissus par de l'esculétine non radioactive, suivie par un marquage à la phénylalanine de très haute activité spécifique n'a pas provoqué l'effet de dilution isotopique attendu : le marquage de l'esculétine n'était toujours pas décelable. Quant à celui de la scopolétine, il n'était inférieur que de peu à celui du témoin.

Ces résultats semblent donc exclure le deuxième schéma, mais nous n'avons aucune preuve que l'esculétine ait bien pénétré dans les tissus.

b) Incorporation directe d'acide férulique

L'acide férulique est présent dans notre matériel, en particulier la forme libre qui est cinétiquement compatible avec un rôle de précurseur de la scopolétine. Trois groupes d'auteurs ont remarqué une activité de la scopoline après administration d'acide férulique radioactif à du blé (23) et à des feuilles de Tabac (24, 70). D'après eux, la scopolétine libre ne se marque pas. L'un de ces auteurs a également administré de l'acide glucosidoférulique et a retrouvé la majeure partie de la radioactivité dans la scopoline (70). Il en conclut le schéma suivant :

acide férulique $\longrightarrow$ acide glucosidoférulique $\longrightarrow$ scopoline $\rightleftharpoons$ scopolétine

Nous avons tenté les incorporations directes des acides férulique et glucosidoférulique pour étudier leur transformation en scopolétine et en scopoline.

- Marquage à l'acide férulique 2-^{14}C

Ce produit a été obtenu par synthèse malonique de la même manière que l'acide cinnamique (figure 13). Nous nous sommes heurtés à de grosses difficultés pour le faire pénétrer dans les tissus. La radioactivité de l'extrait méthanolique était faible ; celle attachée aux tissus après extraction était par contre importante. Il est bien connu que l'acide férulique peut être facilement polymérisé en macromolécules ressemblant aux lignines (71, 72). Le produit radioactif administré avait probablement subi ces transformations avant même de parvenir aux sites de biosynthèse des coumarines.

Nous avons alors essayé de "saturer" les enzymes de polymérisation en plaçant les colonies sur un milieu contenant de l'acide férulique non marqué. Après quatre jours, le précurseur marqué, en solution dans un faible volume de milieu, a été déposé sur les tissus.

Le tableau 18 indique les marquages obtenus : si ceux des formes liées d'acide férulique sont significatifs, il n'en est pas de même de ceux des coumarines. La dilution isotopique dans la scopolétine est forte, même après 6 heures d'incubation, alors que le précurseur administré est théoriquement plus proche d'elle que ceux déjà testés, en particulier l'acide cinnamique.

Cependant, il faut remarquer :

- qu'une activité très forte reste dans les tissus après extraction : la polymérisation de l'acide férulique n'a pas été supprimée mais seulement diminuée, et cela peut expliquer les faibles rendements d'incorporation.

- que la biosynthèse des formes conjuguées d'acide férulique a été augmentée, car les quantités de produit administrées étaient supérieures à celles contenues initialement dans les tissus.

On peut donc penser qu'il ne restait pas beaucoup de précurseur pour la biosynthèse des coumarines, donc que celle-ci a été défavorisée.

En définitive, on peut dire que l'acide férulique a été utilisé dans la biosynthèse de la scopolétine et de la scopoline. Les résultats quantitatifs, probablement faussés par un catabolisme non-spécifique du produit administré, ne nous permettent cependant pas de conclure à une voie unique ou majeure.

TABLEAU I8

Marquages obtenus après administration d'acide férulique 2-^{14}C .

Substances	Activités (dpm)	Rendements d'incorporation (%)	Activités spécifiques (dpm/µM)	Dilutions isotopiques
Scopolétine	I0 000	0,33	57 000	I55
Scopoline	40 000	I,3	4 000	2 200
Ester féruloylglucose	I00 000	3,3	330 000	27
Ester féruloylshikimique	30 000	I,0	I00 000	88
Ester féruloylquinique	2 500	0,08	-	-
Acide glucosidoférulique	I00 000	3,3	350 000	25

Conditions expérimentales :

Nombre de colonies : 7 (poids frais : 2I g)

Précurseur: I,4 µC d'acide férulique d'activité spécifique 4 mC/mM .

Durée d'incubation : 6 heures .

Au cours de cette expérience, nous avons aussi étudié la déméthoxylation de l'acide férulique : aucun marquage n'a pu être décelé dans l'acide caféique.

- Marquage à l'acide glucosidoférulique -$2^{14}C$

Nous avons essayé de répéter, avec notre matériel, l'expérience de STECK (feuilles de Tabac), afin de voir si l'acide glucosidoférulique était, comme dans son cas, un précurseur spécifique de la scopoline (70). La vitesse de formation de ce produit à partir de phénylalanine ou d'acide férulique était compatible avec ce rôle éventuel.

Nous avons synthétisé le produit marqué à l'aide d'une méthode déjà décrite (73) et comportant également une synthèse malonique. La polymérisation de cette substance au cours de la pénétration dans les tissus a été beaucoup moins importante que celle de l'acide férulique : nous avons retrouvé dans l'extrait méthanolique la plus grande partie de l'activité absorbée par les tissus.

Le marquage obtenu pour les coumarines est rapporté dans le tableau 19. Nous avons également mesuré ceux des formes d'acide férulique ne comportant pas le groupement : glucoside de phénol, c'est-à-dire l'acide libre et les esters.

Les résultats obtenus montrent que :

- si la scopoline est marquée, il en est de même de la scopolétine. La répartition de radioactivité entre ces deux substances est analogue à celle observée après incubation en présence d'acide férulique.

- le produit administré a été hydrolysé, par conséquent il n'est pas possible d'interpréter les marquages observés. Cependant, cette hydrolyse est lente, car après 6 heures nous avons retrouvé intacte plus de la moitié du précurseur absorbé par les tissus : la radioactivité assez faible trouvée pour la scopoline montre que l'acide glucosidoférulique n'est pas un intermédiaire important dans sa biosynthèse. Mais si nous avions laissé métaboliser le produit très longtemps, le bilan aurait peut-être été différent : toutes les réactions se faisant, hydrolyses et estérifications, la radioactivité se trouvera finalement dans le produit à renouvellement le plus lent, c'est-à-dire la scopoline.

TABLEAU I9

Marquages obtenus après administration d'acide glucosidoférulique 2-^{14}C

Substances	Radioactivités :dpm (Activités spécifiques:dpm/µM)	Rendements d'incorporation (%)
Scopolétine	I5 000 (I35 000)	0,5
Scopoline	75 000 (8 500)	2,8
Acide férulique libre	I8 000	0,7
Ester féruloylglucose	I50 000	5,6
Ester féruloylshikimique	I00 000	3,7

Conditions expérimentales :

Nombre de colonies : 7 (2I G de poids frais)

Précurseur : 5 µC d'acide glucosidoférulique 2-^{14}C d'activité spécifique I0 mC/mM .

Durée d'incubation : 6 heures .

c) La réaction de méthylation

L'administration d'acide férulique radioactif ne nous a pas permis d'évaluer la spécificité de l'étape de méthylation dans la biosynthèse de la scopolétine. Une autre façon d'aborder le problème consistait à administrer un précurseur radioactif "donneur de méthyle", la L-méthionine méthyle-^{14}C. Les études portant sur la biosynthèse des acides-phénols cinnamiques ont presque toujours été faites avec des précurseurs marqués sur le squelette phénylpropanique ; la méthionine n'a été que rarement utilisée (74, 75).

Dans notre cas, l'utilisation de méthionine semblait particulièrement séduisante :

- elle permet d'introduire un marquage à un niveau de la chaîne métabolique théoriquement assez proche de la scopolétine : il était intéressant de voir si les résultats concernant les vitesses relatives de marquage des deux coumarines étaient retrouvés avec ce précurseur.

- elle facilite l'étude de la transformation d'acide férulique en scopolétine : les acides-phénols antérieurs à l'acide férulique ne doivent pas se marquer ; on peut donc envisager des expériences de "chassage" de la radioactivité de l'acide férulique dans la scopolétine.

- Marquage à la méthionine en aérobiose

Nous avons comparé les radioactivités obtenues à partir de méthionine et de phénylalanine. Les concentrations de ces acides aminés dans les tissus de Tabac cultivés in vitro sont très différentes ; il en était de même des activités spécifiques des deux produits radioactifs dont nous disposions. Trois expériences parallèles, schématisées sur la figure 16 ont été effectuées. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 17 et dans le tableau 20 :

- On observe la distribution habituelle de radioactivité dans les acides-phénols à partir de phénylalanine. Mais seul l'acide férulique se marque à partir de méthionine. Précisons que toutes les formes d'acide férulique précédemment identifiées sont radioactives. L'influence de la méthionine exogène sur le marquage à la phénylalanine est peu importante.

- La méthionine est un précurseur plus efficace que la phénylalanine : les dilutions isotopiques dans tous les produits sont plus faibles. Nous retrouvons une fois de plus la grande différence entre les activités spécifiques de la scopolétine et de la scopoline, et cela

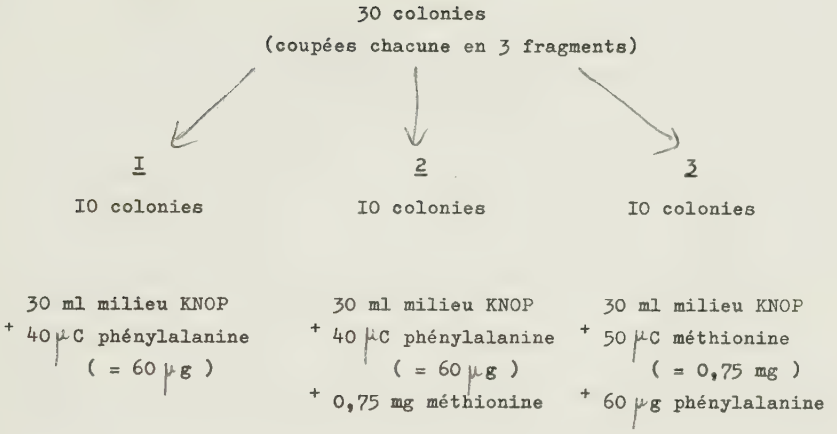


FIGURE : I6

TABLEAU 20

Comparaison des marquages obtenus à partir de phénylalanine et de méthionine. (dpm/µM)

Activités spécifiques / Expériences	A^S acide férulique total	A^S scopolétine	A^S scopoline	$\frac{A^S \text{ scopolétine}}{A^S \text{ scopoline}}$
I	I80 000 (I 200)	220 000 (I 000)	6 400 (34 000)	34
2	200 000 (I I00)	280 000 (780)	7 500 (29 000)	37
3	360 000 (6I)	450 000 (49)	9 300 (2 400)	48

Les chiffres entre parenthèses représentent les dilutions isotopiques

L'activité spécifique de l'acide férulique a été déterminée après hydrolyse.

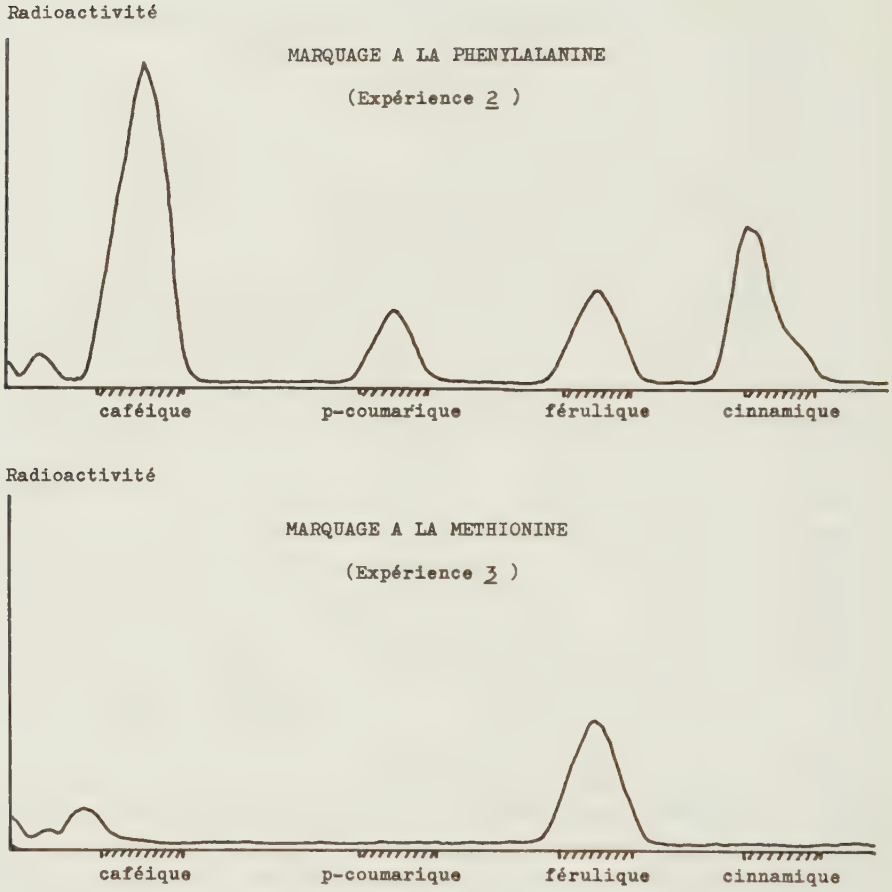


FIGURE : 17

DISTRIBUTION DE RADIOACTIVITE DANS LA FRACTION ACIDE OBTENUE APRES HYDROLYSE .

Conditions expérimentales :

durée d'incubation : 4 heures

précurseurs : phenylalanine d'activité spécifique 80 mC/mM

méthionine d'activité spécifique IO mC/mM

à partir d'un précurseur complètement indépendant de ceux déjà utilisés.

- Si on compare les activités spécifiques respectives des expériences 2 et 3, on constate que les différences relatives sont du même ordre de grandeur pour tous les produits : ce résultat est en faveur d'une voie majeure passant par l'acide férulique ; si une importante méthylation d'esculétine s'était faite, le marquage des coumarines aurait dû être nettement plus élevé dans l'expérience 3.

Nous avons également démontré la localisation du marquage dans la scopolétine après méthylation à la méthionine : l'esculétine obtenue par déméthoxylation chimique n'est pas radioactive :

2 mg

30 000 dpm

0,2 mg

pas d'activité décelable

(mouvement propre du compteur: 4 dpm)

Etude du "chassage" de la radioactivité de l'acide férulique

Pour étudier ce "chassage", il faut, dans un premier temps, marquer l'acide férulique, mais non ses précurseurs : la figure 17 montre que cela est possible avec la méthionine radioactive, mais pas avec la phénylalanine. Puis il faut prélever les tissus et les mettre sur un milieu contenant de la méthionine non radioactive : on peut ainsi suivre le catabolisme de l'acide férulique dont le marquage doit diminuer.

Nous avons étudié cette diminution de radioactivité et sa répercussion sur le marquage de la scopolétine. La cyclisation en coumarine (qu'il s'agisse de l'esculétine ou de la scopolétine) est une étape

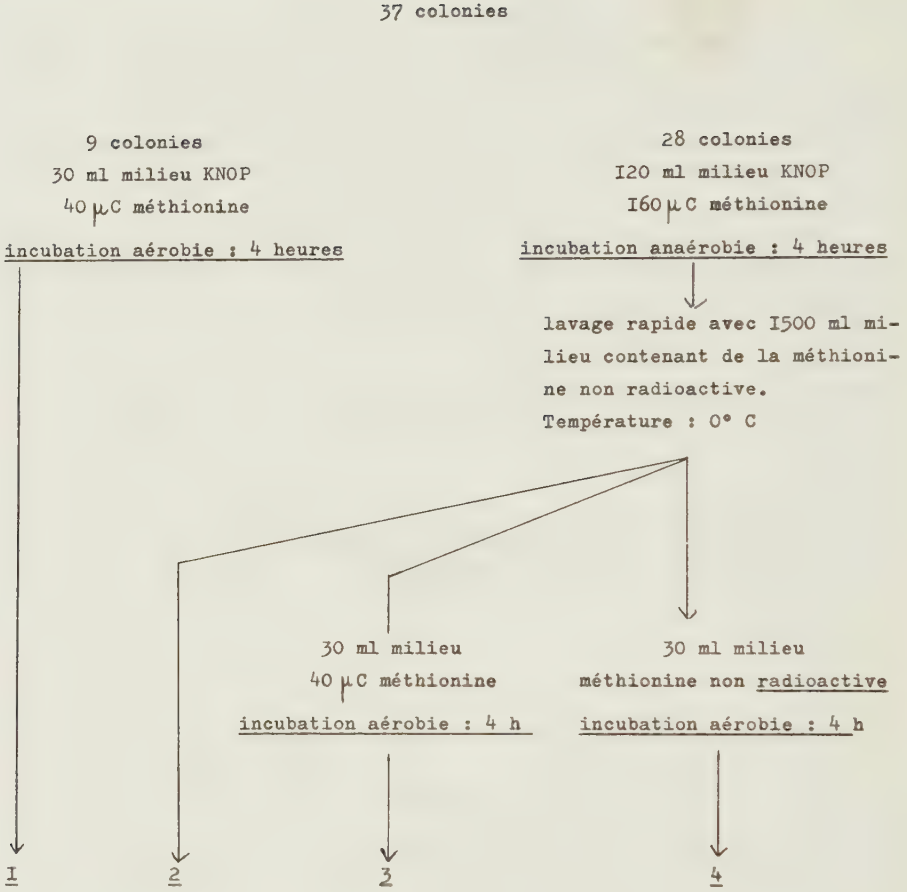


FIGURE : I8

CONDITIONS DE L'EXPERIENCE DE CHASSAGE D'ACIDE FERULIQUE .

TABLEAU 2I

"Chassage de l'acide férulique.

Activités spécifiques / Expériences	A^s acide férulique total	A^s scopolétine	A^s scopoline	$\frac{A^s \text{ scopolétine}}{A^s \text{ scopoline}}$
I Aérobiose	I60 000	200 000	5 900	35
2 Anaérobiose	II0 000	5 300	380	I4
3 Anaérobiose + aérobiose	220 000	250 000	I2 500	20
4 Anaérobiose + chassage	69 000	I5 000	2 300	6,2

Les activités spécifiques sont exprimées en dpm/µM .

aérobie, contrairement à la méthylation qui est anaérobie. Si on effectue une incubation anaérobie en présence de méthionine radioactive, on s'attend à trouver un marquage pour l'acide férulique, mais pas pour la scopolétine ou la scopoline (ou du moins très faible : il peut y avoir une méthylation des quelques traces d'esculétine éventuellement présentes mais qui ne se renouvellent pas en anaérobiose). Après transfert des tissus sur un milieu nouveau contenant de la méthionine non radioactive, deux observations sont possibles a priori :

- si la scopolétine et la scopoline sont marquées, leur précurseur devait être radioactif après l'incubation anaérobie : ce précurseur doit alors nécessairement être l'acide férulique.
- si les coumarines ne sont pas marquées, leur précurseur n'était pas radioactif après la méthylation anaérobie ; ce serait alors la preuve que la voie majeure fait intervenir la cyclisation avant la méthylation.

Les conditions expérimentales sont décrites sur la figure 18, les résultats obtenus donnés dans le tableau 21.

Remarquons tout de suite que :

- nous aurions dû étudier les variations de l'activité de l'acide férulique libre : mais cette activité est trop faible pour être mesurée avec précision.
- la diminution de l'activité de l'acide férulique total ne peut pas être due à un échange de "méthyle", nous l'avons montré plus haut.
- il se peut qu'il soit resté de la méthionine marquée dans les tissus même après transfert sur le milieu non radioactif.

Si l'on compare les expériences entre elles, on aboutit aux conclusions suivantes :

1-2 : en anaérobiose l'acide férulique se marque nettement, contrairement aux coumarines (l'activité de la scopoline n'est pas significative) ; cependant l'anaérobiose n'a pas été parfaite.

2-3 : l'incubation en anaérobiose et le traitement à 0°C n'ont pas supprimé le potentiel de cyclisation en coumarines.

2-4 : il y a diminution de l'activité de l'acide férulique au cours du chassage, mais elle est moins importante que prévu : certaines formes d'acide férulique sont à renouvellement assez lent.

L'activité des coumarines est augmentée, et cela confirme le rôle d'intermédiaire de l'acide férulique. Une expérience analogue dont

le chassage a été plus court a permis de constater une diminution plus faible de l'activité de l'acide férulique total et une augmentation plus nette de celle de la scopolétine : l'acide férulique libre est probablement le précurseur de la scopolétine dont l'activité se chasse à son tour, comme semble le montrer le rapport des activités scopolétine/scopoline qui est le plus faible dans le cas de l'expérience 4 (chassage).

Cette expérience assez compliquée n'apporte finalement pas de preuves, mais elle est en accord avec tous les résultats déjà obtenus.

- Méthylations par un système enzymatique

THIES (48) avait essayé de méthyler l'acide caféique à l'aide d'un système enzymatique obtenu à partir de clones de Tabac : il n'avait observé aucune fluorescence au niveau de l'acide férulique. Des auteurs étaient parvenus pourtant à méthyler l'acide caféique libre et l'acide chlorogénique à l'aide d'une O-méthyltransférase extraite du rat (76, 77). Plus récemment, HESS a pu méthyler l'acide caféique en acide férulique et l'acide hydroxy-5 férulique en acide sinapinique (74, 75).

Nous avons essayé également de méthyler l'acide caféique ou l'acide chlorogénique à l'aide de la fraction "enzymes solubles" obtenue après centrifugation à 100.000 g, fraction qui nous avait permis d'accumuler l'acide cinnamique. Pour avoir une grande sensibilité dans la détection des produits formés, nous avons utilisé de la méthionine radioactive.

Les premiers essais effectués sur cette fraction étaient peu reproductibles, mais sa dialyse préalable contre un tampon identique a permis d'obtenir des activités plus fortes et plus reproductibles dans l'acide férulique. Dans ce qui suit, le surnageant a toujours subi ce traitement.

Nous avons étudié l'influence de trois facteurs sur ce système de méthylation : l'addition d'adénosine-triphosphate, l'influence du pH, et l'influence du substrat.

Dépendance vis-à-vis de l'A.T.P. :

En l'absence d'A.T.P. nous n'avons jamais pu déceler la moindre trace d'acide férulique radioactif : ce résultat n'est pas étonnant puisque l'on sait que le donneur de méthyle biologique est la S-adénosylméthionine.

Influence du pH : Pour étudier l'influence de ce facteur nous avons choisi les conditions suivantes :

Surnageant : provenant de 3 cultures
ATP : 20 µM
Substrats : 0,5 µM acide caféique + 0,5 µM acide chlorogénique
Précurseur : 20 µC de méthionine méthyle-^{14}C (2 µM) d'activité spécifique 10 mC/mM
Durée : 1 heure

Les pH étaient compris entre 6,8 et 8,2.

Le pH optimum pour la méthylation se situe aux environs de 7,4. A ce pH nous avons obtenu pour l'acide férulique une radioactivité de 45.000 dpm 2×10^{-2} µC. Cette radioactivité est facilement décelable et mesurable. Pourtant, l'activité enzymatique de la O-méthyltransférase est faible : l'activité spécifique du produit final est égale à celle du précurseur, ce qui signifie que 2×10^{-3} µM seulement de substrat ont été méthylés. Il aurait été impossible de déceler cette quantité d'acide férulique sans l'utilisation d'éléments marqués.

Les radioactivités observées ont été suffisantes pour nous permettre d'étudier l'influence du facteur le plus intéressant dans notre cas : le substrat.

Influence du substrat

Les conditions d'incubation ont été les mêmes que précédemment en ce qui concerne le surnageant, l'ATP, le précurseur et la durée. Le pH choisi est de 7,4.

Nous avons essayé séparément 3 substrats possibles de méthylation : l'acide caféique libre, l'acide chlorogénique, et l'esculétine.

L'acide caféique libre a donné les meilleurs résultats : avec ce substrat, nous avons obtenu de façon reproductible 3 fois plus d'activité dans l'acide férulique qu'avec l'acide chlorogénique. Mais en partant d'esculétine, nous n'avons jamais pu trouver de scopolétine radioactive.

On peut conclure de ces résultats que la méthylation est assez spécifique. D'autre part, l'acide férulique se présente une fois de plus comme l'intermédiaire dans la biosynthèse de la scopolétine : le système enzymatique étudié méthyle les deux substances (acide caféique et acide chlorogénique) identifiées dans les tissus, mais est incapable de méthyler l'esculétine dans les mêmes conditions. Remarquons cependant qu'il est possible qu'une dégradation de la scopolétine ait eu lieu dès sa formation : ce produit est facilement oxydé par les

peroxydes à pH = 7 (42).

d) Influence sur la biosynthèse des coumarines d'une dilution isotopique au niveau de l'acide férulique

Après prétraitement des tissus de Tabac par des doses importantes d'acide férulique, apparaît un phénomène pour le moment inexpliqué : un marquage à la phénylalanine donne des activités considérables dans les acides-phénols libres, mais les formes liées sont moins marquées, comme nous l'avons indiqué plus haut.

La répercussion sur le marquage des coumarines conduit par contre à des résultats très clairs, indiqués dans le tableau 22.

Comparons les deux premières expériences :
la réaction de méthylation s'est faite normalement (activités identiques pour l'acide férulique libre). Si ce dernier est un intermédiaire, on explique le non-marquage des coumarines par un effet de dilution isotopique. Si l'esculétine est un intermédiaire, l'enzyme de cyclisation a dû être inhibée par les fortes doses d'acide férulique.

Comparons les deux dernières expériences :
en admettant la dernière hypothèse, l'enzyme de cyclisation en esculétine doit toujours être inhibée puisque les doses d'acide férulique administrées ont augmenté : or, on constate un marquage plus important des coumarines. Ce résultat est par contre tout à fait compatible avec la première hypothèse, car l'activité de l'acide férulique libre a également beaucoup augmenté : il s'agit bien d'une dilution isotopique.

Ce résultat, sans constituer une preuve directe, apporte l'un des arguments les plus solides en faveur d'une voie biosynthétique unique passant par l'acide férulique libre et est en accord avec tous les résultats précédents.

e) La cyclisation

Les travaux concernant la formation de coumarines plus simples (coumarine, ombelliférone, herniarine) ont abouti à l'établissement d'un schéma de cyclisation assez compliqué : pour que cette transformation ait lieu, le carboxyle doit se trouver en position cis par rapport à la chaîne latérale (90, 91). L'ordre des transformations serait très spécifique : cet ordre est schématisé dans le tableau 3.

TABLEAU 22

Expériences de dilution isotopique.

Marquages / Expériences	A acide caféique libre (dpm)	A acide férulique libre (dpm)	A^s scopolétine (dpm/µM)	A^s scopoline (dpm/µM)
Témoin	$2,I \times I0^4$	$5,0 \times I0^4$	I82 000	700
Dilution I	$2,4 \times I0^4$	$5,0 \times I0^4$	2 000	290
Dilution II	$25 \times I0^4$	$75 \times I0^4$	45 000	I 000

Conditions expérimentales :

Nombre de colonies : I0

Préincubations pendant 4 heures :

témoin :avec milieu seul

dilution I : avec de l'acide férulique 2,5 mM/l

dilution II: avec de l'acide férulique I5 mM/l

Incubations de 40 minutes avec 60 µC de phénylalanine (U) ^{I4}C d'activité spécifique 200 mC/mM .

Dans notre cas, il faut bien imaginer un schéma différent, du moins pour expliquer la formation de la scopolétine libre. Deux étapes au moins,semblent obligatoires : l'isomérisation de la double liaison et une étape oxydative.

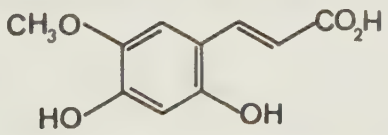
- Isomérisation de la double liaison : influence de la lumière

Un certain nombre d'auteurs pensent que l'isomérisation est purement photochimique (78, 79). Pour vérifier ce point dans le cas de notre matériel nous avons effectué une incubation en présence de phényl alanine marquée et en l'absence de lumière : tableaux 23 et 24.

Les conditions expérimentales utilisées ne permettent pas de tirer la moindre conclusion en ce qui concerne la biosynthèse des acides-phénols : beaucoup d'auteurs pensent que la phénylalanine désaminase et l'acide cinnamique hydroxylase sont induites par la lumière (80-85). Dans notre cas, il ne semble pas qu'il y ait de différence, mais il se peut que la moindre trace de lumière suffise pour l'induction. Or nous n'avons pas la garantie d'une obscurité parfaite. Le fait qu'il n'y ait pas de différence nous permet de comparer valablement les marquages des coumarines.

En ce qui concerne la biosynthèse des coumarines, les différences d'activité observées ne sont pas du tout significatives. Cette fois, les conditions d'obscurité sont suffisantes pour affirmer que ce résultat n'est pas compatible avec une isomérisation purement photochimique.

- Recherche de l'acide hydroxy-2 férulique



Cette substance proviendrait de l'acide férulique par hydroxylation enzymatique. L'isomère cis se cyclise spontanément en scopolétine : le rôle d'intermédiaire de ce produit apparaît donc logique.

Sa recherche est rendue difficile à cause de 2 phénomènes :

- la cyclisation immédiate de l'isomère cis : si l'on chromatographie de l'acide hydroxyférulique on observe toujours la présence d'une bande fluorescente supplémentaire au niveau de la scopolétine. A chaque opération chromatographique, on perd une partie de la substance.

TABLEAU 23

Comparaison des radioactivités des acides libres

Acides libres / Expériences	p-coumarique	caféique	férulique
Lumière	210 000	20 000	45 000
Obscurité	180 000	19 000	43 000

Les radioactivités sont exprimées en dpm .

TABLEAU 24

Comparaison des activités spécifiques des coumarines

Activités spécifiques / Expériences	A^s scopolétine	A^s scopoline
Lumière	463 000	2 500
Obscurité	358 000	1 420

Les activités spécifiques sont exprimées en dpm/µM

Conditions expérimentales relatives aux deux tableaux :

Poids frais de matériel : 30 g

Précurseur: 60 µC de phénylalanine d'activité spécifique 200 MC/mM .

Durée d'incubation : 40 minutes

Conditions d'éclairage : pour le témoin, conditions habituelles ; l'autre erlenmeyer a été entouré de plusieurs couches de papier d'aluminium.

- ce produit peut être préparé chimiquement à partir de scopolétine : il suffit d'ajouter celle-ci à une solution fortement basique. On est donc assuré de trouver de l'acide hydroxyférulique si l'on a effectué une hydrolyse basique sur une fraction contenant de la scopolétine.

En prenant les précautions d'opérer autant que possible à l'abri de la lumière et d'éviter toute hydrolyse basique, nous avons essayé d'identifier cette substance. Nous l'avons recherchée après marquage à la phénylalanine, à la méthionine, à l'acide férulique, et avec ou sans préincubation d'acide hydroxyférulique non radioactif. Huit tentatives de ce genre n'ont pas permis de mettre en évidence une activité significative. Cependant, il faut remarquer que tous ces essais manquaient de sensibilité : l'activité éventuellement mesurée aurait dû être multipliée par un facteur de 10, afin de compenser les pertes importantes au cours de la purification. S'il s'agit d'un produit à renouvellement rapide, on comprend facilement qu'il ait échappé à notre attention.

On ne peut rejeter l'existence de ce produit et son rôle d'intermédiaire, cependant nous n'avons jamais constaté un effet de dilution isotopique après son administration comme nous l'avons obtenu avec l'acide férulique.

Comment interpréter d'aussi grandes différences avec la biosynthèse des autres coumarines déjà décrites ? Le méthoxyle sur le noyau aromatique de l'acide férulique et de la scopolétine représente davantage qu'un simple substituant supplémentaire : il apporte une contribution importante du point de vue de la répartition électronique dans les molécules. Celles-ci contiennent le squelette du gaiacol : or on sait que cette substance donne facilement des radicaux libres. Cela est vrai pour d'autres substances du même type : alcool coniférylique, acide férulique, scopolétine. La transformation d'acide férulique en scopolétine se fait peut-être par un processus radicalaire sous l'influence d'enzymes du type des peroxidases, enzymes dont l'activité dans notre matériel est importante.

CONCLUSION.

Cette étude de la biosynthèse de la scopolétine aboutit au schéma donné sur la figure 18. Notre contribution la plus importante dans l'établissement de ce schéma aura été de démontrer les points suivants:

- le processus de formation de la scopolétine est différent de celui de l'ombelliférone, coumarine monohydroxylée en position 7 : dans notre cas, la synthèse préalable et rapide de la scopolétine libre exclut l'intervention d'un intermédiaire comme l'acide glucosidoférulique ou comme l'acide diglucosido-2,4, méthoxy-6 cinnamique. Dans le cas de la formation de la scopoline, ces intermédiaires sont possibles, mais la voie majeure est la glucosidation de la scopolétine libre.

- l'acide cinnamique libre est un intermédiaire à renouvellement particulièrement rapide dans la biosynthèse de la scopolétine.

- la présence d'un groupement méthoxyle et le peu de spécificité des enzymes de méthylation rendaient vraisemblables plusieurs voies biosynthétiques après l'acide caféique : en combinant le maximum de méthodes d'approche (incorporation directe d'acide férulique, méthylation à la méthionine in vivo et in vitro, étude du chassage de la radioactivité de l'acide férulique, expériences de dilution isotopique) nous avons obtenu des résultats qui sont tous en faveur d'une voie métabolique unique passant par l'acide férulique libre : la méthylation précède donc la cyclisation. Dans notre cas comme dans celui des coumarines déjà étudiées, la cyclisation se fait lorsque tous les substituants sur le noyau aromatique sont en place.

Pour aboutir à ces conclusions nous avons utilisé une méthodologie un peu particulière : en plus des incorporations directes classiques de produits plus ou moins élaborés, de nombreuses études de vitesses de formation ont été effectuées. L'utilisation comme matériel d'étude des tissus cultivés in vitro nous a beaucoup aidés : il a été possible d'effectuer des marquages très courts (5 minutes), indispensables à l'établissement d'une cinétique, tout en obtenant des radioactivités significatives. Une méthode de détermination d'activités spécifiques de produits acétylables par double comptage a été appliquée avec succès aux acides-phénols intervenant dans la biosynthèse ; elle est plus sensible, plus rigoureuse et plus précise que la méthode spectrophotométrique.

Nous avons constaté, grâce à ces méthodes, que les vitesses de renouvellement de la plupart des produits phénoliques étudiés sont élevées : il n'est pas nécessaire de marquer pendant des jours, comme cela

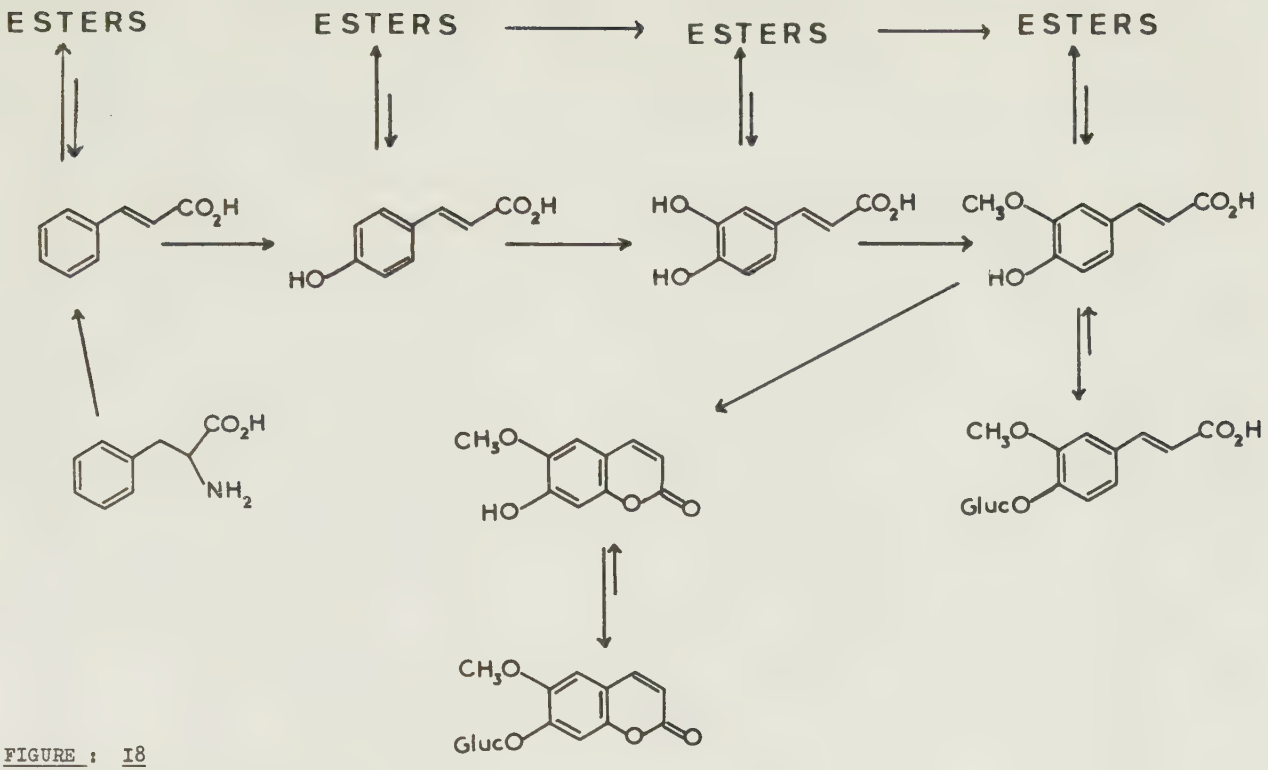


FIGURE : I8

SCHEMA BIOSYNTHETIQUE PROPOSE

a été souvent fait, mais de marquer fortement (86, 87).

Le résultat le plus important au point de vue biologique est sans doute la mise en évidence de la grande vitesse de renouvellement de l'acide chlorogénique et de la scopolétine libre. Ces deux phénols sont donc catabolisés dans la cellule. Pour l'instant, on ne sait rien sur les mécanismes de leur dégradation.

PARTIE EXPERIMENTALE

A - INCUBATIONS

Elles ont été effectuées en présence ou en absence d'air.

1 - En aérobiose

Nous avons utilisé deux sortes de milieu : un milieu liquide ou un milieu solide.

a) En milieu liquide

Les colonies sont prélevées des tubes de culture, divisées en petits fragments dans une boîte de Pétri et maintenues pendant la durée choisie (3 mn à 10 heures) dans un erlenmeyer contenant 12 à 30 ml (suivant le nombre de colonies) de milieu liquide additionné du précurseur marqué. Toutes les opérations s'effectuent stérilement. Le milieu liquide utilisé est, la gélose en moins, identique au milieu de culture. Les "erlenmeyer" sont disposés sur un appareil rotatif de manière à assurer une oxygénation suffisante des cultures. La température d'incubation est de 25ºC. Au bout du temps choisi les fragments sont prélevés par filtration, lavés rapidement à l'eau distillée puis congelés dans un bain à - 50ºC.

b) En milieu solide

Cette méthode se rapproche de celle utilisée en général pour les plantes entières : comme précédemment, les colonies sont prélevées des tubes de culture et divisées en 3 ou 4 fragments. Ceux-ci sont ensuite disposés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé ordinaire. Le précurseur radioactif, en solution dans un tampon ou dans du milieu, est déposé sous forme de gouttes sur les fragments : la solution de précurseur est concentrée, son volume ne dépasse pas 1 ou 2 ml. On laisse ensuite métaboliser pendant le temps choisi.

Ce procédé est préférable au précédent dans le cas de marquages longs ou de précurseurs pénétrant difficilement.

2 - En anaérobiose

Dans ces expériences, les petits fragments sont disposés dans un ballon tricol contenant du milieu de culture liquide dans lequel

barbote un courant d'azote (la pureté de l'azote est de 99,8 %). Deux des cols permettent l'entrée et la sortie de l'azote. L'azote est introduit grâce à un dispositif spécial comprenant 2 filtres "Millipore" destinés à le stériliser. Le troisième col du ballon est fermé par une membrane élastique : le précurseur est injecté à travers cette membrane à l'aide d'une seringue. Grâce à cette membrane on peut maintenir l'atmosphère d'azote dans le ballon tout en ajoutant le précurseur marqué : il n'y a donc pas d'apport d'oxygène au cours de cette opération.

Avant l'injection du produit radioactif on fait barboter l'azote dans le milieu pendant une heure de manière à éliminer l'air. Puis, toujours sous azote, on ajoute le précurseur marqué. On laisse ensuite barboter l'azote pendant la durée de l'expérience.

Au moment du prélèvement, les tissus sont inévitablement en contact avec l'air et on risque alors de perdre une partie du bénéfice de l'anaérobiose. Pour ralentir au maximum toute transformation due à une étape aérobie, nous avons refroidi le ballon à 0ºC à la fin de l'expérience. Après prélèvement, les tissus sont lavés rapidement avec de l'eau également refroidie à 0ºC, puis congelés à - 50ºC.

B - EXTRACTION DES TISSUS

Après congélation à - 50ºC, les tissus sont lyophilisés : cette opération nécessite 24 à 36 heures. Puis ils sont extraits au méthanol chaud.

Dans le cas des dosages de coumarines (Partie I), l'extraction devait être complète : nous l'avons faite au soxhlet pendant 12 heures.

Dans le cas des expériences de marquage nous avons préféré renoncer au soxhlet : nous avons extrait avec 5 portions de méthanol bouillant représentant un volume total de 100 ml pour 1 g de tissu sec : ainsi l'extrait ne contient pas trop de sucres, ce qui nous facilite les opérations chromatographiques. En ce qui concerne les produits étudiés, l'extraction est pratiquement complète dans ces conditions : même s'il y a des pertes, elles n'interviennent pas dans l'évaluation des radioactivités spécifiques.

C - REACTIONS CHIMIQUES UTILISEES

1 - Hydrolyses

Nous avons effectué les hydrolyses soit sur le résidu de l'extrait méthanolique, soit sur les formes liées isolées.

Hydrolyse basique

Elle permet de libérer les acides engagés dans des liaisons "ester". Nous avons utilisé les conditions suivantes :

- solution de soude 5 N
- température : ordinaire
- durée : 20 mn.

Pour éviter une trop forte oxydation des acides-phénols, en particulier de l'acide caféique, nous avons ajouté un peu d'hydroquinone et opéré sous azote.

Hydrolyse acide

Nous l'avons utilisée pour libérer la scopoline et l'acide férulique à partir de leurs glucosides. Elle a été faite avec HCl 4 N, à une température de 90ºC et pendant 15 minutes.

2 - Isomérisation de la double liaison cinnamique

Il s'agit en fait d'une réaction photochimique : les composés cinnamiques trans sont transformés en leur isomère cis et inversement sous l'action de la lumière. On aboutit à un état d'équilibre des deux isomères. Pour révéler les produits sur les papiers de chromatographie nous les avons visualisés à l'aide d'une lampe à rayons ultra-violets, car ils sont fluorescents. Mais cette opération les isomérise et on aboutit toujours à un mélange d'isomères. Ceux-ci peuvent être séparés par chromatographie sur papier, mais au moment de la révélation chacun donne à nouveau un mélange d'isomères.

Cette propriété a constitué pour nous un critère d'identification très spécifique des dérivés de l'acide cinnamique. En effet, le processus expérimental permettant de les isoler comprend : une extraction au bicarbonate de sodium, une chromatographie sur papier avec le benzène comme solvant mobile. D'après ce processus, les contaminants de

chaque produit cinnamique comportent une fonction acide forte et le même nombre de substituants sur le noyau aromatique. Il peut donc s'agir de composés benzoïques, phénylacétiques, phénylpropioniques, phénylbutyriques, etc. possédant les mêmes substituants sur le noyau aromatique : mais ces contaminants ne possèdent pas une double liaison permettant l'existence de 2 isomères, contrairement aux produits qui nous intéressent. Nous donnons plus loin les exemples de contrôle de radioactivité que nous avons ainsi pu effectuer.

De façon plus générale, toute substance fluorescente et marquée à partir de phénylalanine, qui donne toujours 2 taches par chromatographie sur papier avec des solvants aqueux, est susceptible de contenir une double liaison cinnamique..

3 - Méthylation

Les substances que nous avons eu à manipuler comportaient 2 sortes de groupements fonctionnels : fonction acide carboxylique ou fonction phénol ou les 2 fonctions.

On sait que le réactif de méthylation spécifique des acides carboxyliques est le diazométhane. Mais ce réactif permet également de méthyler les fonctions phénols de molécules très conjuguées : nous avons pu méthyler avec ce réactif tous les phénols décrits dans ce travail.

Nous donnons un exemple de ces réactions de méthylation (figure 19) : le cas de l'acide para-coumarique.

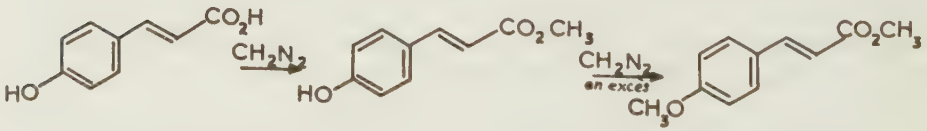


FIGURE : 19

Il est bien connu que les acides carboxyliques, chromatographiés sur couche mince de silice, ont tendance à donner des traînées. Par contre, leurs esters méthyliques ne présentent pas ce défaut. La méthylation des acides nous a permis d'obtenir des dérivés chromatographiables sur couche mince de silice : ainsi la scopolétine et l'acide para-coumarique se séparent mal en chromatographie sur papier, mais la séparation de leurs dérivés méthylés sur couche mince de silice est très bonne.

Acétylation

Les fonctions phénoliques sont acétylables par l'anhydride acétique dans la pyridine suivant le schéma donné sur la figure 20.

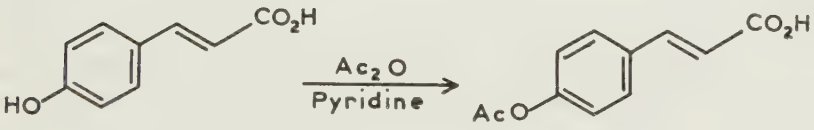


FIGURE : 20

Cette réaction nous a permis de préparer des dérivés subissant en chromatographie sur papier des migrations complètement différentes de celles des produits de départ. Après méthylation de la fonction acide carboxylique restante on peut également les chromatographier sur couche mince de silice.

Mais nous avons surtout utilisé l'acétylation comme méthode de dosage en vue de la détermination des radioactivités spécifiques : pour cela nous avons effectué la réaction avec de l'anhydride acétique tritié d'activité spécifique connue. L'acétate obtenu comporte un double marquage. Nous donnons plus loin les détails expérimentaux de cette méthode.

D - ISOLEMENT DES SUBSTANCES

1 - Techniques chromatographiques

L'extraction des tissus au méthanol est très peu sélective, aussi avons-nous été très tributaires de la chromatographie qui a été la technique de base de l'ensemble du travail.

Comme adsorbants nous avons utilisé la silice et le papier Whatman nº 1 et nº 2 : nous les symboliserons par $SiO2$, W_1 et W_2 respectivement. Nous avons souvent remarqué que des substances difficilement séparables par chromatographie sur couche mince se séparaient facilement par chromatographie sur papier : on voit donc l'intérêt de combiner les 2 méthodes.

Les systèmes de solvant choisis nous ont permis de combiner également la chromatographie d'adsorption et la chromatographie de partage : ainsi avec la première le R_F de l'acide férulique est inférieur à celui de l'acide para-coumarique : en effet la polarité de l'acide férulique est la plus grande car il possède un groupement méthoxy de plus. Ce groupement augmente par ailleurs la solubilité dans les solvants organiques : cela veut dire qu'en chromatographie de partage c'est l'acide férulique qui migrera le plus.

Nous indiquons les systèmes de solvant utilisés dans ce travail et leur attribuons des symboles qui nous permettront de décrire plus facilement les opérations d'isolement.

Chromatographie sur couche mince	Solvant	Symbole
SiO_2	méthanol : 20 ; chloroforme : 80	M20/C
	méthanol : 5 : chloroforme : 95	M5/C
	acétate d'éthyle : 50 ; cyclohexane : 50	A50/Cy
	acétate d'éthyle : 20 ; cyclohexane : 80	A20/Cy
Chromatographie sur papier		
W_1	benzène : 6 ; acide acétique : 7 ; eau : 3	Bz/A/W
	butanol : 14 ; pyridine : 3 ; eau : 3	B/P/W
	propanol : 10 ; solution d'ammoniaque : 1	P/N/W

W_2	acide acétique : 2 ; eau : 98	A/W
	formiate de sodium : 10 ; acide formique : 1 ; eau : 200	F/F/W
	butanol : 4 ; acide acétique : 1 ; eau : 5	B/A/W

Il faut signaler les propriétés particulières des systèmes les plus utilisés :

le système W_1 Bz/A/W sépare très bien les acides-phénols cinnamiques (88)

le système W_1 B/P/W sépare les différentes classes de formes liées (70)

le système W_1 A/W a été le plus utilisé pour la séparation des isomères trans et cis (88, 89).

Indiquons également que les élutions des substances non méthylées et non acétylées ont été faites au méthanol ou à l'éthanol. Ces solvants ont ensuite été évaporés sous le vide d'une pompe à palette, c'est-à-dire à une température inférieure à 0ºC. Nous avons élué les produits méthylés ou acétylés à l'éther.

2 - Processus expérimental permettant d'isoler les coumarines, les acides libres et l'ensemble des formes liées

a) Isolement des coumarines

La moitié de l'extrait méthanolique est concentrée sous vide et chromatographiée sur couche mince de silice avec le solvant M20/C. A la lampe à rayons ultra-violets on voit deux bandes fluorescentes bleues : la moins polaire correspond à la scopolétine ; l'autre, très intense, correspond à la scopoline.

La scopolétine est rechromatographiée successivement sur papier avec les systèmes W_1 Bz/A/W et W_1 A/W : dans ces conditions le produit isolé est spectrophotométriquement et radiochimiquement pur.

La scopoline est rechromatographiée dans le système W_1 B/A/W : elle est alors spectrophotométriquement pure. Mais il y a encore des contaminants radioactifs : pour les éliminer nous avons hydrolysé la scopoline en milieu acide, extrait la scopolétine à l'éther, et chromatographié celle-ci dans les systèmes W_1 Bz/A/W et W_1 A/W.

b) Isolement des acides-phénols

On utilise l'autre moitié de l'extrait méthanolique auquel on ajoute environ 50 µg d'entraîneur de chaque acide-phénol. Le méthanol est évaporé à sec sous vide. On ajoute au résidu 10 à 15 ml d'une solution HCl diluée de pH 2 : à ce pH les acides libres sont extractibles à l'éther.

Acides libres

On extrait donc la solution aqueuse par l'éther : la phase éthérée contient les acides libres fortement contaminés. Pour les purifier, on utilise leur propriété d'acide fort : on extrait la phase éthérée par une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium. Après acidification par HCl 4 N, celle-ci est à son tour extraite à l'éther, et la nouvelle phase éthérée ainsi obtenue contient les acides libres.

L'extrait est chromatographié dans le système W_1 Bz/A/W : les acides, séparés, sont radiochimiquement purs, à l'exception de l'acide cinnamique qui doit être rechromatographié dans le système W_1 A/W.

Ensemble des formes liées

La solution aqueuse initiale, débarrassée des acides libres, est additionnée de soude afin d'obtenir une concentration 5 N. La saponification est effectuée dans les conditions décrites précédemment. Puis on acidifie avec HCl concentré jusqu'à obtention d'une concentration 4 N : on hydrolyse à chaud. Après refroidissement on extrait à l'éther, et cette phase éthérée est traitée au bicarbonate de sodium comme décrit ci-dessus.

Les opérations chromatographiques sont identiques à celles décrites pour les formes libres.

3 - Processus expérimental permettant de déterminer les radioactivités spécifiques de toutes les substances identifiées (à l'exception de l'acide cinnamique)

Nous schématisons ce processus expérimental sur la figure 21 : tous les acides-phénols sont finalement obtenus sous forme libre, car c'est sous cette forme que nous leur appliquons la technique du double comptage.

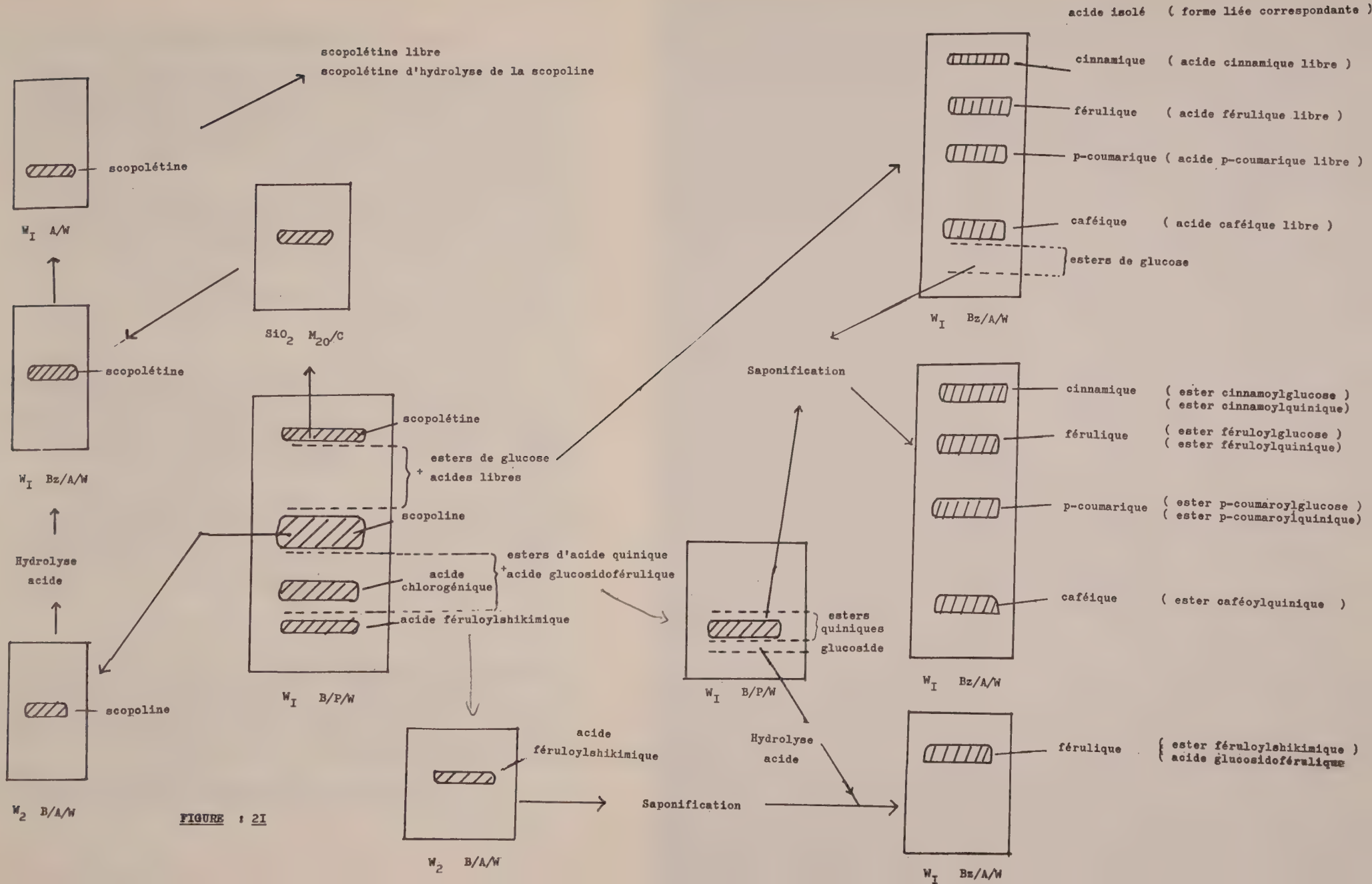

scopolétine libre
scopolétine d'hydrolyse de la scopoline
scopolétine
W I A/W
SiO2 M20/C
scopolétine
W I Bz/A/W
Hydrolyse acide
scopoline
W2 B/A/W
scopolétine
esters de glucose + acides libres
scopoline
esters d'acide quinique + acide glucosidoférulique
acide chlorogénique
acide féruloylshikimique
W I B/P/W
acide féruloylshikimique
W2 B/A/W
Saponification
acide isolé (forme liée correspondante)
cinnamique (acide cinnamique libre)
férulique (acide férulique libre)
p-coumarique (acide p-coumarique libre)
caféique (acide caféique libre)
esters de glucose
W I Bz/A/W
Saponification
esters quiniques
glucoside
W I B/P/W
cinnamique (ester cinnamoylglucose) (ester cinnamoylquinique)
férulique (ester féruloylglucose) (ester féruloylquinique)
p-coumarique (ester p-coumaroylglucose) (ester p-coumaroylquinique)
caféique (ester caféoylquinique)
W I Bz/A/W
Hydrolyse acide
férulique { ester féruloylshikimique) (acide glucosidoférulique
W I Bz/A/W

FIGURE : 21

E - CONTROLE DE LA PURETE RADIOCHIMIQUE

Il s'agit sans doute de la partie la plus délicate d'un travail d'étude biosynthétique. En effet les méthodes décrites pour obtenir la pureté spectrophotométrique de substances phénoliques sont nettement insuffisantes quand on veut mesurer leur radioactivité : cela est d'autant plus vrai que les précurseurs sont moins spécifiques (phénylalanine, méthionine).

Il s'agit donc de montrer que les radioactivités mesurées correspondent bien au produit qui nous intéresse et non à une substance de contamination d'activité spécifique élevée. La position de l'activité a été déterminée par autoradiographie ou par un lecteur de radioactivité.

Les contrôles que nous avons effectués peuvent se classer en 2 catégories :

- contrôles de "routine"
- contrôles particuliers.

Les contrôles de "routine" concernent les 2 processus expérimentaux qui sont décrits ci-dessus : nous avons systématiquement passé au lecteur de radioactivité tous les chromatogrammes obtenus lors de ces isolements. D'une étape à l'autre les correspondances devaient s'améliorer et devenir parfaites au cours de la dernière.

Les contrôles particuliers ont été effectués chaque fois que nous utilisions un précurseur radioactif nouveau ou quand, à la suite d'une mauvaise opération de chromatographie, nous avions des doutes sur la pureté radiochimique de la substance isolée. Ces contrôles utilisent 2 méthodes : la radiochromatographie fonctionnelle et la recristallisation à activité spécifique constante.

1 - Radiochromatographie fonctionnelle

Le principe de cette méthode est le suivant : les substances isolées sont transformées chimiquement grâce aux réactions décrites précédemment. Les dérivés ainsi obtenus sont chromatographiés : leur migration est différente de celle de la substance initiale.

La radioactivité, initialement liée à la substance de départ,

doit maintenant être liée au dérivé.

Cette méthode de contrôle sera d'autant plus efficace et rigoureuse que les réactions sont plus spécifiques et que le nombre de dérivés successifs sera plus grand.

a) Scopolétine

En ce qui concerne la scopolétine, nous avons surtout utilisé la réaction de méthylation : avec un léger excès de diazométhane la méthylation est partielle : on a 2 pics de radioactivité qui doivent être superposables aux bandes fluorescentes (figure 22). Avec un large excès de diazométhane la méthylation est totale (figure 23).

b) Acides-phénols

Nous discuterons le cas de l'acide para-coumarique. Ce produit, isolé après chromatographie dans le système W_1 Bz/A/W, se présente comme un mélange d'isomères. Si on le chromatographie sur papier avec un solvant aqueux on obtient 2 taches auxquelles se superpose un pic de radioactivité. Au niveau de l'acide para-hydroxybenzoïque, entraîneur ajouté qui se sépare des isomères trans et cis, il y a également un peu d'activité (figure 24). Après révélation à la lampe à rayons ultra-violets, chaque tache représente à nouveau un mélange d'isomères qui, rechromatographié dans le même système, redonnera 2 taches accompagnées chacune d'un pic de radioactivité, etc.

Nous avons utilisé 2 solvants aqueux : le meilleur semble être le mélange formiate de sodium - acide formique (88), mais les élutions sont difficiles dans ce cas. Lorsque nous désirions éluer les produits, nous avons préféré utiliser le mélange acide acétique : 2 ; eau : 98 (89).

L'acide para-coumarique ainsi élué peut ensuite être méthylé : les figures 25 et 26 montrent les diagrammes de radioactivité obtenus après méthylations partielle et totale. Toutes ces opérations peuvent être répétées avec les autres acides. Signalons cependant que l'acide cinnamique ne comporte qu'une fonction méthylable et que l'acide caféique cis, peu stable, se transforme en esculétine.

2 - Recristallisation à activité spécifique constante

Cette technique, très classique, consiste à vérifier que les

CONTROLE DE LA RADIOACTIVITE DE L'ACIDE PARA-COUMARIQUE.

Radioactivité

FIGURE : 25

Chromatographie sur couche mince de silice (méthanol/chloroforme:5/95 puis acétate d'éthyle/cyclohexane :20/80) d'un mélange obtenu par méthylation de l'acide p-coumarique avec un très léger excès de diazométhane.

Radioactivité

FIGURE : 26

Chromatographie sur couche mince (mêmes conditions que ci-dessus) du dérivé obtenu par méthylation de l'acide p-coumarique avec un large excès de diazométhane.

propriétés de cristallisation du produit radioactif et du produit de référence sont identiques. On rajoute ce dernier au produit radioactif, on recristallise le mélange un certain nombre de fois, et on mesure l'activité spécifique après chaque recristallisation. S'il y a identité entre substance radioactive et entraîneur, cette activité spécifique doit être constante.

Nous avons appliqué cette technique à la scopolétine, à la scopoline et aux acides para-coumarique, caféique et férulique.

a) Coumarines

La scopolétine libre isolée, additionnée de 150 mg de scopolétine de référence, a été recristallisée 5 fois avec un mélange d'éthanol et d'éther de pétrole. Nous avons prélevé chaque fois environ 1 mg de substance, l'avons pesée exactement et mesuré son activité.

Tableau 25

Recristallisations de la scopolétine

Recristallisations	Activité spécifique : dpm/mg
1	365
2	355
3	376
4	345
5	372

L'incertitude portant sur ces résultats est assez élevée, de l'ordre de 10 % : elle est due à la pesée (double pesée sur 1 mg environ), aux fluctuations de comptage, à la répartition de la substance sur les coupelles : nous avons dû utiliser un compteur à circulation de gaz, car en comptage en scintillation liquide la désactivation due à des masses fluorescentes aussi fortes est trop importante. Cependant l'activité spécifique est stable.

La scopoline isolée, additionnée de 100 mg de scopoline que nous avons synthétisés à l'aide d'une méthode déjà décrite (93), a été recristallisée dans l'éthanol.

Tableau 26

Recristallisations de la scopoline

Recristallisations	Activité spécifique : dpm/mg
1	1590
2	1592
3	1530
4	1680

Dans ce cas on observe également une bonne stabilité de l'activité spécifique.

b) Acides-phénols

Ceux-ci ont été chromatographiés dans le système W_1 A/W : nous avons élué les taches au niveau des isomères "trans" en évitant autant que possible l'isomérisation. A chaque produit nous avons ajouté 150 mg d'entraîneur "trans", puis nous avons effectué 5 recristallisations dans un mélange éthanol - éther de pétrole. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 27.

Tableau 27

Activités spécifiques (dpm/mg) des acides-phénols après recristallisation

Recristallisations	Acide p-coumarique	Acide caféique	Acide férulique
1	1 000	470	120
2	950	430	80
3	990	420	77
4	995	450	82
5	980	440	80

L'ensemble de ces résultats montre que les radioactivités décelées sont bien liées aux substances étudiées.

F - DOSAGES ET DETERMINATIONS DES RADIOACTIVITES SPECIFIQUES

Le problème le plus difficile à résoudre lors de ces déterminations est celui du dosage. Dans notre cas nous avons pourtant été avantagés par la forte conjugaison des molécules, rendant possible le dosage par spectrophotométrie ultra-violette et par spectrophotofluorimétrie. En fait nous n'avons appliqué ces méthodes qu'au dosage de la scopolétine et de la scopoline. Pour les acides-phénols nous avons utilisé la méthode du double comptage : cela peut paraître surprenant puisque ces substances sont également fluorescentes et absorbent fortement dans l'ultra-violet. Nous nous sommes cependant heurté à un certain nombre de difficultés :

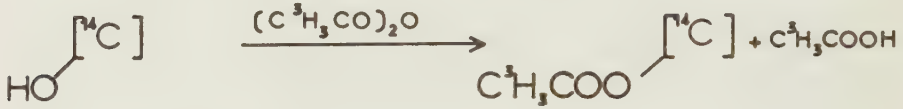
- le nombre élevé d'étapes nécessaires à la purification radiochimique rendait inévitable l'isomérisation de la double liaison cinnamique des substances étudiées. Or il est maintenant connu que les coefficients d'extinction moléculaire des isomères trans et cis sont nettement différents (96, 97). Comme on ne peut jamais connaître la proportion exacte des isomères dans un mélange, le dosage spectrophotométrique ne peut être rigoureux, il en est de même du dosage par fluorimétrie (les isomères cis ne sont pas fluorescents).

- dans notre cas particulier nous avons eu à manipuler des quantités très faibles de ces substances, à l'exception de l'acide chlorogénique. Nous étions à la limite de la sensibilité de la méthode spectrophotométrique, surtout en ce qui concerne le dosage de l'acide para-coumarique. D'autre part, dans ces conditions, nous avons observé une déformation des spectres vers 275 mμ due vraisemblablement à la formation d'un complexe entre les acides et une substance présente dans le papier de chromatographie.

Nous avons donc mis au point avec Benveniste une méthode originale de mesure des activités spécifiques (98). Nous ne décrivons ici que les avantages apportés dans notre cas et le processus expérimental mis en oeuvre.

Le dosage spectrophotométrique est remplacé par un dosage fonctionnel : l'acétylation de la fonction phénol par de l'anhydride acétique tritié d'activité spécifique connue. Le principe de l'acétylation par de l'anhydride acétique radioactif est couramment utilisé de-

puis plusieurs années (99-108) pour le dosage d'hormones stéroïdes. Nous avons transposé cette méthode à notre problème. Après avoir isolé une substance phénolique marquée au ^{14}C à la suite d'une incorporation d'un précurseur, nous avons fait agir sur elle l'anhydride tritié suivant le schéma :



Le double comptage permettra de déterminer le rapport des radioactivités $^{14}C/3$ H qui est proportionnel à l'activité spécifique de la substance étudiée. Cette façon de procéder a de nombreux avantages :

- la sensibilité du dosage peut être augmentée à volonté, il suffit de jouer sur l'activité spécifique de l'anhydride utilisé.
- l'addition de produit entraîneur est possible une fois l'acétylation terminée : on n'est donc pas limité dans les étapes de purification du marquage dû aux 2 radioéléments : on s'arrête quand le rapport $^{14}C/3$ H reste constant.
- la précision obtenue pour l'activité spécifique ne dépend que d'une seule mesure : le double comptage, opération facile et courante avec des compteurs à scintillation liquide modernes.

Cette technique, appliquée à nos problèmes, permet de supprimer tous les inconvénients du dosage spectrophotométrique : les acides-phénols s'acétylent rapidement et quantitativement : il n'y a pas de discrimination entre les isomères trans et cis, nous aurons donc un dosage rigoureux. Grâce à la forte sensibilité obtenue en jouant sur le marquage de l'anhydride utilisé, il est possible de déterminer l'activité l'activité spécifique des acides-phénols libres. En utilisant de l'anhydride tritié à 30 mC/mM nous avons pu mesurer l'activité spécifique de l'acide p-coumarique libre, ce qui, à notre connaissance, n'avait jamais été fait.

Nous indiquons dans ce qui suit les processus expérimentaux

des différents dosages.

1 - Dosages spectrophotométriques et spectrophotofluorimétriques

Pour le dosage de la scopolétine nous avons mesuré l'absorption dans l'ultra-violet à 346 mμ. Quand les quantités de substance étaient trop faibles, nous avons fait le dosage par spectrophotofluorimétrie, méthode déjà décrite (18). Cette technique est très sensible : elle permet de doser facilement moins d'un microgramme de substance. En ce qui concerne la scopoline, très abondante, la méthode spectrophotométrique a été largement utilisée : nous avons mesuré l'absorption à 340 mμ. Dans la plupart des cas la scopoline a été hydrolysée en scopolétine et celle-ci dosée par mesure de l'absorption à 346 mμ.

Les comptages des coumarines ont été effectués en général à l'aide de compteurs à circulation de gaz.

2 - Dosage de l'azote protéique

Il a été effectué selon la technique de KJEHLDAHL modifiée (109).

3 - Méthode du double comptage

Nous nous bornerons ici à décrire le processus expérimental utilisé pour purifier les acétates doublement marqués.

Après acétylation avec un mélange de 10 μl de pyridine et de 20 μl d'une solution benzénique à 10 % d'anhydride acétique tritié, on évapore les réactifs en excès sous vide. L'acétate radioactif est alors additionné de 0,5 à 1 mg d'acétate entraîneur. La plus grande partie de la contamination ^{3}H s'élimine par chromatographie sur couche mince. Mais les acétates d'acides-phénols comportent encore une fonction acide carboxylique qu'il faut méthyler. D'autre part, les acétates subissent, surtout sur des plaques très activées, une légère hydrolyse. Le processus expérimental mis au point remédie à ces inconvénients, il comporte 3 étapes chromatographiques :

- l'acétate est chromatographié sur papier W_1 avec le système

Bz/A/W : on le révèle grâce à sa fluorescence et on l'élue avec de l'acétone qui est évaporé sous vide.

- le résidu est repris à l'éther et méthylé avec un excès de diazométhane. On obtient donc de l'acétate méthylé qui est chromatographié sur couche mince de silice fluorescente HF : on peut ainsi facilement visualiser l'entraîneur qui donne une bande sombre sur fond fluorescent. Le solvant de migration est le mélange (acétate d'éthyle : 50 ; cyclohexane : 50). Si la substance à acétyler était présente en très faibles quantités, nous lui avons ajouté un "protecteur" : quelques microgrammes de scopolétine. Celle-ci donne également un acétate tritié qui se sépare très bien des acétates méthylés d'acide-phénol lors de cette étape chromatographique. Nos lecteurs de radioactivité permettent de discriminer les 2 radioéléments, la figure 26 donne un exemple de diagramme de radioactivité. On voit qu'il y a une très bonne correspondance pour les 2 radioéléments au niveau de l'acétate méthylé entraîneur. On élue cette substance à l'éther.

- on la rechromatographie dans le ler système : W_1 Bz/A/W qui sépare le produit d'hydrolyse qui aurait pu se former au cours de l'étape précédente et qui fausserait le rapport de comptage. L'élution est faite à l'éther.

Il suffit à présent d'effectuer un double comptage et de calculer l'activité spécifique. Signalons que les fioles de comptage en scintillation liquide ne doivent pas contenir plus de 300 g de produit entraîneur : au-dessus de cette valeur une correction de "quenching" est nécessaire.

Remarquons également que dans le cas de l'acide caféique on obtient un diacétate et qu'il faut en tenir compte dans le calcul.

ACETATE METHYLE D'ACIDE PARA-COUMARIQUE DOUBLEMENT MARQUE.

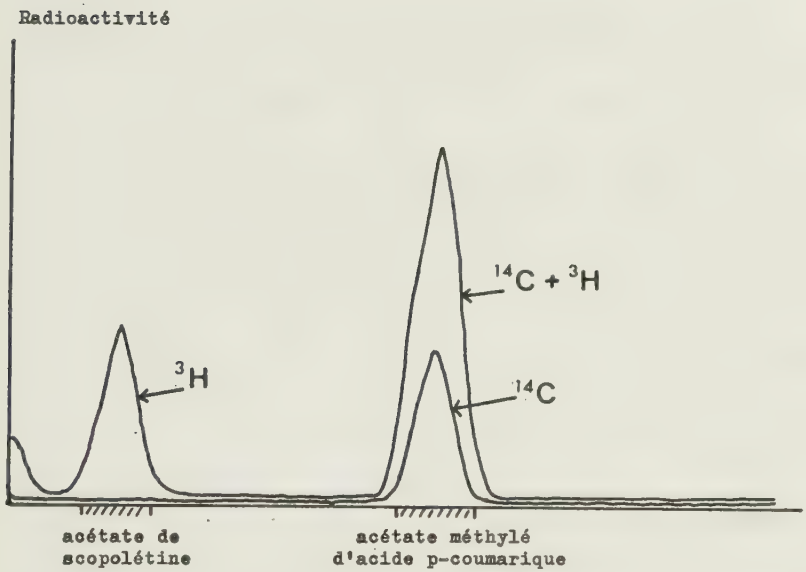


FIGURE : 26

Chromatographie sur couche mince de silice du mélange obtenu par méthylation au diazométhane du 1er éluat. Solvant de migration : acétate d'éthyle/cyclohexane (50/50)

La scopolétine ajoutée comme protecteur de l'acide p-coumarique avant acétylation donne un acétate uniquement marqué au tritium.

G - PRODUITS MARQUES

Un certain nombre des produits marqués utilisés sont commerciaux : la L-phénylalanine (U)^{14}C, la D,L-phénylalanine - 2 - ^{14}C, la L-méthionine - méthyle-^{14}C proviennent du C. E. A. L'acide malonique - 2 - ^{14}C provient du "Radiochemical Center", Amersham.

Nous avons dû préparer nous-mêmes les acides cinnamique, férulique et glucosidoférulique par synthèse malonique. Nous nous sommes inspirés de méthodes déjà décrites pour la synthèse de quelques grammes de ces substances (73, 110, 111). La difficulté dans notre cas résulte des faibles quantités manipulées (de l'ordre du mg) : la purification n'a pas pu être faite par cristallisation, mais par extraction et chromatographie.

H - COMPTAGES

Nous donnons les caractéristiques des compteurs utilisés :

Lecteur de radioactivité : limites de détection :

BERTHOLD	^{14}C	1 000 - 1 500 dpm
	^{3}H	10 000 dpm

Nous avons considéré comme non marquées des substances non décelables au lecteur.

Compteurs à scintillation liquide :

		rendements maximum	mouvements propres
PACKARD	^{14}C	62 %	16 cpm
	^{3}H	28 %	40 cpm
BECKMAN	^{14}C	96 %	25 cpm
	^{3}H	56 %	30 cpm
Compteurs à circulation de gaz :			
NUCLEAR-CHICAGO	^{14}C	35 %	25 cpm
BECKMAN Lowbeta II	^{14}C	20 %	1 cpm

BIBLIOGRAPHIE

I- R.J. BEST,Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci., I4,I99, (I936)

2- R.J. BEST,Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci., 22,25I, (I944)

3- R.J.BEST ,Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci., 26,22I, (I948)

4- L. REPPEL,Planta Med.,7,206, (I959)

5- T.E. RAWLINS,H.E. THOMAS, Phytopathology,36,245, (I94I)

6- W.A. ANDREAE,Canad.J.Res. ,26C,3I, (I948)

7- W.A. ANDREAE,Canad.J.Res. ,27C,I5, (I949)

8-R.C. LINDLER,Science, I07,I7, (I948)

9-R.C. LINDLER,H.C. KIRKPATRICK,T.E. WEEKS,Science, II2,II9, (I950)

IO- T.A. GEISSMAN,Arch.Biochem.Biophys., 60,2I, (I956)

II- C. MARTIN,G. MOREL,C.R.Acad.Sci.Paris, 246,2283, (I958)

I2- T. MINAMIKAWA,Plant Physiol., 38,493, (I963)

I3- H.H. MAYR,A. DISKUS,W. BECK,Phytopathol.Zeitschr., 47,95, (I963)

I4- D.J. AUSTIN,D.D. CLARKE, Nature, 2I0,II65, (I966)

I5- H. FEHRMANN, Phytopathol.Zeitschr., 56,398, (I966)

I6- J.A. SARGENT, F. SKOOG, Physiol.Plantarum, I4,504, (I96I)

I7- P. BENVENISTE, G. MUNAVALLI, L. HIRTH, G. OURISSON, C.R.Acad.Sci., 257, 2704, (I963)

I8- L.J. DIETERMAN, C.Y. LIN, L. ROHRBOUAH, Anal.Biochem.,9,I39, (I964)

I9- F. SKOOG, G. MONTALDI, Proc.Nat.Acad.Sci., 47,36, (I96I)

20- W.A. ANDREAE, Nature, I70,83, (I952)

2I- W.A. ANDREAE, S.R. ANDREAE, Canad.J.Bot., 3I,426, (I953)

22- J.H. FULTS, G.A. JOHNSON, Proc.Western Weed Control Conference,Denver, p. I08, (I950)

23- H. REZNIK, R. URBAN, Natuwissenschaften, 44,I3, (I957)

24- V.C. RUNECKLES, Canad.J.Biochem.Physiol., 4I,2259, (I963)

25- W.W. REID, Chem. and Ind., I439, (I958)

26- S.A. BROWN, Phytochem., 2,I37, (I963)

27- S.A. BROWN, G.H.N. TOWERS, D. CHEN, Phytochem., 3,469, (I964)

28 - D.J. AUSTIN, M.B. MEYERS, Tetrahedron Letters, I4,765, (I964)

29 - D.J. AUSTIN, M.B. MEYERS, Phytochem., 4,245, (I965)

30 - D.J. AUSTIN, M.B. MEYERS, Phytochem., 4 255, (I965)

3I - R.J. GAUTHERET, La culture des tissus végétaux,Masson,Paris, (I959)

32 - T. MURASHIGE, F. SKOOG, Physiologia Plantarum, I5,473, (I962)

33 - HELLER , Thèse, Paris, (I953)

34 - C. MATHIS, G. OURISSON, J.Chromatog., I2,96, (I963)

35 - S.A. BROWN, A.C. NEISH, Canad.J.Biochem.Physiol., 33,948, (I955)

36 - D.R. Mc CALLA, A.C. NEISH, Canad.J.Biochem.Physiol., 37,537, (I959)

37 - F. BARNOUD, T. HIGUCHI,J.P. JOSELEAU,A. MOLLARD, C.R.Acad.Sci., 259, 4339, (I964)

38 - T. KOSUGE, E.E. CONN, J.Biol.Chem., 234,2I33, (I959)

39 - T. KOSUGE, E.E. CONN, J.Biol.Chem., 236,I6I7, (I96I)

40 - S.A. BROWN, A.C. NEISH, Canad.J.Biochem.Physiol., 34,769, (I956)

4I - A.C. NEISH, Phytochem., I,I (I96I)

42 - G.W. SCHAEFFER,J.G. BUTA, F. SHARPE, Physiologia Plantarum, 20,342,(I967)

43 - J.B. HARBORNE, J.J. CORNER, Biochem.J., 8I,242, (I96I)

44 - C.C. LEVY, M. ZUCKER, J.Biol.Chem., 235,24I8, (I960)

45 - A.H. WILLIAMS, Chem. and Ind/, I200, (I958)

46 - C. LENTNER, F.E. DEATHERAGE, Chem. and Ind., I33I, (I958)

47 - J. CORSE, E. SONDHEIMER, R. LUNDIN, Tetrahedron, I8,I207, (I962)

48 - W. THIES, Dissertation, Göttingen, (I965)

49 - L. BERGMANN, W. THIES, K. ERDELSKY, Zeitschr.Naturf., 20b,I297, (I965)

50 - V.C. RUNECKLES, K. WOOLRICH, Phytochem., 2,I, (I963)

5I - S.Z. El-BASYOUNI, A.C. NEISH, G.H.N. TOWERS, Phytochem., 3, 627, (I964)

52 - S.Z. El-BASYOUNI, A.C. NEISH, Phytochem., 5,683, (I966)

53 - O.L. GAMBORG, Canad.J.Biochem., 45,I45I, (I967)

54 - L. BERGMANN, Ber.Deut.Bot.Ges., 78,30, (I966)

55 - S. ASEN, S.L. EMSWILLER, Phytochem., I,I69, (I96I)

56 - J. KOUKOL, E.E. CONN, J.Biol.Chem., 236,2693, (I96I)

57 - P. BENVENISTE, L. HIRTH, G. OURISSON, C.R.Acad.Sci., 265,I749, (I967)

58 - P.M. NAIR, L.V. VINING, Phytochem., 4,I6I, (I965)

59 - D.W. RUSSEL, E.E. CONN, Arch.Biochem.Biophys., I22,256, (I967)

60 - A.O. TAYLOR, M. ZUCKER, Plant Physiol., 4I,I350, (I966)

6I - A.O. TAYLOR, Phytochem., 7,63, (I968)

62 - P.E. PILET, Phytochem., 3,6I7, (I964)

63 - C. YANG, H.D. BRAYMER, P.L. PETRAKIS, M.R. SHETLER, S.H. WENDER, Arch. Biochem.Biophys., 75,538, (I958)

64 - J. KAGAN, J.Amer.Chem.Soc., 88,26I7, (I966)

65 - A.N. BOOTH,O. H. EMERSON, F.T. JOHNS, F. De EDS, J.Biol.Chem.? 229, 5I, (I957)

66 - L.J. DIETERMAN, C.H. YANT, Y. NAGAGAWA, S.H. WENDER, J.Org.Chem., 24, II34, (I958)

67 - H. KALA, Planta Med., 6,I86, (I958)

68 - W.L. BUTLER, H.W. SIEGELMAN, Nature, I83, I8I3, (I959)

69 - C.F. SUMERE, H. TENCHY, L. MASSART, Clin.Chim.Acta, 4,590, (I959)

70 - W. STECK, Canad.J.Biochem., 45,889, (I967)

7I - H.A. STAFFORD , Plant.Physiol., 35,I08, (I960)

72 - H.A. STAFFORD , Plant.Physiol., 35,6I2, (I960)

73 - R.M. HANN, J.Amer.Ghem.Soc., 56,I63I, (I934)

74 - D. HESS, Zeitschr.Pflanzenphysiol., 55,374, (I966)

75 - M.H. ZENK, Zeitschr.Pflanzenphysiol., 53,404, (I965)

76 - J. PELLERIN, A. D'IORIO, Canad.J.Biochem.Physiol., 36,49I, (I958)

77 - B.J. FINKLE, R.F. NELSON, Nature, I97,902, (I963)

78 - K.J. EDWARDS,J.R. STOKER, Phytochem., 7,73 , (I968)

79 - K.J. EDWARDS,J.R. STOKER, Phytochem., 6,655, (I967)

80 - C. NITSCH, J.P. NITSCH, C.R.Acad.Sci., 262,II02, (I966)

8I - M. ZUCKER, Plant Physiol., 40,779, (I965)

82 - T.H. ATTRIDGE, H. SMITH, Arch.Biochem.Biophys., I48,805, (I967)

83 - F. DURST, H. MOHR, Naturwissenschaften, 53,53I, (I966)

84 - F. DURST, H. MOHR, Naturwissenschaften, 53,707, (I966)

85 - G. ENGELSMA, Nature, III7, (I965)

86 - P. BENVENISTE, L. HIRTH, G. OURISSON, Phytochem., 5,3I (I966)

87 - J.D. EHRHARDT, L. HIRTH, G.OURISSON, Phytochem., 6,8I5, (I967)

88 - R.K. IBRAHIM, G.H.N. TOWERS, Arch.Biochem.Biophys., 87,I25, (I960)

89 - J.S. CHALLACE, A.H. WILLIAMS, J.Chromatog., 2I,357, (I966)

90 - F.A. HASKINS, H.J. GORZ, Science, I39,496, (I963)

9I - S.A. BROWN, Science, I37, 977, (I962)

92 - C. PAUPARDIN, C.R.Acad.Sci., 26I,4206, (I965)

93 - D.N.CHAUDHURY, R.A. HOLLAND, A. ROBERTSON, J.Chem.Soc., I672, (I948)

94 - M.R. YOUNG, G.H.N. TOWERS, A.C. NEISH, Canad.J.Bot., 44,34I, (I966)

95 - J.A. SARGENT, F. SKOOG, Plant Physiol., 35,934, (I960)

96 - G. KAHNT, Biolog.Zentralblatt, 85,545, (I966)

97 - G. KAHNT, Phytochem. ,6,755, (I967)

98 - B. FRITIG, P. BENVENISTE, Phytochem., (sous presse)

99 - B. KLIMAN, R.E. PETERSON, J.Biol.Chem., 235,I639, (I960)

I00 - R.E. PETERSON, E.A. EILERS, PROceed. 2nd Intern.Cong.Endocrinology, London, (I965)

I0I - W.W. DAVIS, L.R. BURWELL, G. KELLEY, A.G.T. CASPER, F.C. BATTER, Arch. Biochem.Biophys.Res.Comm.,22,2I8,(I966)

I02 - B. KLIMAN, Advances in Tracer Methodology, 2,2I3, (I965)

I03 - M.A. RIVAROLA, C.J. MIGEON, Steroids, 7,I03, (I966)

I04 - J.F. TAIT, B. LITTLE, S.A.S. TAIT, A. RIONDEL, C. FLOOD,E. JOACHIM, M. GUT, Advances in Tracer Methodology, 2,227, (I965)

I05 - P.J. COLLIPP, J.R. PATRICK, C. GOODHEART, S.A. KAPLAN, Proc.Soc.Exp. Med.,I2I,I73, (I966)

I06 - P.J. COLLIPP, S.A. KAPLAN, D.C. BOYLE, C.S.N. SHIMIZU, S.M. LING, Nature,207,876, (I965)

I07 - J.FISHURAN, O. GURNY, R.S. ROSENFELD, T.F. CALLAGHER, Steroids, I0,3I7, (I967)

I08 - P.E. SCHULZE, M. WENZEL, Proc.Conf.Methods Preparing and Storing marked Molecules,Brussels,November I963.

I09 - G. LEBEURIER, Thèse 3e cycle,Paris, (I959)

II0 - F. VORSATZ, J. Praktische Chemie, I45,265, (I936)

III - S.A. BROWN, A.C. NEISH, Canad.J.Biochem.Physiol., 33,948, (I955)

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION I

MATERIEL ET METHODES

I MATERIEL 8

II METHODES

I) Expériences I0

2) Analyse des extraits méthanoliques I2

RESULTATS

I VARIATIONS AU COURS DE LA CROISSANCE DES COLONIES DES TENEURS EN SCOPOLETINE ET EN SCOPOLINE.

A. Tissus sins I8

B. Tissus virosés 2I

II ETUDE A L'AIDE D'ELEMENTS MARQUES DE LA BIOSYNTHESE DE LA SCOPOLETINE ET DE LA SCOPOLINE

A. Formation des deux coumarines à partir de phenylalanine 23

B. Recherche d'intermédiaures dans la biosynthèse de la scopolétine 27

C. Etudes des différentes étapes de la biosynthèse

I. Etapes antérieures à la méthylation 44

2. Les étapes de méthylation et de cyclisation

a) Recherche de l'esculétine 55

b) Incorporation directe d' acide férulique 56

c) La réactio de méthylation 60

d) Influence sur la biosynthèse des coumarines d'une dilution isotopique par l'acide férulique 69

e) La cyclisation 69

CONCLUSION 74

PARTIE EXPERIMENTALE

A. Incubations 77

B. Extractions des tissus 78

C. Réactions chimiques utilisées 79

D. Isolrment des substances 82

E. Contrôle de la pureté radiochimique 86
F. Dosages et déterminations des radioactivités spécifiques 93
G. Produits marqués 98
H. Comptages 98

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde Thèse :

Génétique des pigments floraux

Strasbourg, le 27 mai 1968
Le Président du Jury,

G. OURISSON

VU et permis d'imprimer

Strasbourg, le 7 juin 1968

Le Doyen,

Pour le Doyen
L'assesseur,

J. BRENET